



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM BIOLOGICKÝCH ÚČINKŮ TECHNICKÉHO
KONOPI A JEHO FRAKCÍ**

BIOLOGICAL EFFECTS OF VARIOUS HEMP FRACTIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Hana Vacková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0996/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Hana Vacková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Studium biologických účinků technického konopí a jeho frakcí

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Charakterizace rostliny technické konopí, zpracování čerstvých rostlin a jejich částí
- 2) Analýza vybraných aktivních složek z různých částí technického konopí
- 3) Testování biologických účinků extraktů z konopí

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Hana Vacková
student(ka)

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Konopí jako jediné v rostlinné říši obsahuje kanabinoidy, díky nim má obrovský potenciál, který není ještě dopodrobna prozkoumán. Tato práce pojednává o analýzách technického konopí. V teoretické části se pojednává o účincích kanabinoidů a analýzách, které se využívají k charakteristice konopí. V experimentální části jsou zahrnuty metody charakterizující konopí, stanovení antimikrobiální účinku a analýza tenkovrstvé chromatografie. Využity byly tři odrůdy *Cannabis Sativa* L. a to Finola, Fedora, Kompolti. Spektrofotometricky byl stanovený obsah polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivita připravených tinktur. Další součástí práce je stanovení antimikrobiálního působení extraktů. Měření bylo provedeno pomocí stanovení inhibičního účinku měřením zákalu a diskového testu. K těmto testům byli vybráni zástupci Grampozitivních, Gramnegativních bakterií a zástupce kvasinek. Bylo prokázáno antimikrobiální působení tinktur z konopí na použité mikroorganismy. Některé tinktury vykazovaly podobný účinek jako antibiotika, která jsou používána na léčbu bakteriálních infekcí. Tenkovrstvá chromatografie umožnila vizualizaci kanabinoidů v připravených tinkturách.

Klíčová slova

technické konopí, Finola, Fedora, Kompolti, antimikrobiální účinek, TLC, polyfenoly, flavonoidy, antioxidační aktivita, *Cannabis sativa* L., *Candida glabrata*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*

Abstract

Cannabis is the only plant which contains cannabinoids and thanks to these compounds it has enormous potential. This thesis deals with the analysis of technical hemp. Effects of cannabinoids and methods used for cannabis analysis are discussed in the theoretical part. The experimental part includes spectrophotometric characterization of cannabis, it's antimicrobial effects and thin layer chromatography analysis. Three sorts of *Cannabis sativa* L. were analyzed, namely Finola, Fedora and Kompolti. Firstly, the content of polyphenols, flavonoids and antioxidant activity in prepared tinctures were determined. Moreover, antimicrobial test were performed using disk test and turbidity determination. Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeast organism were tested. It was found that cannabis tinctures possess good antimicrobial effects. Some of them are comparable with synthetic antibiotics. Finally, thin layer chromatography enabled visualization of cannabinoids in prepared tinctures.

Key words

Technical hemp, Finola, Fedora, Kompolti, antimicrobial effect, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, *Cannabis sativa* L., *Candida glabrata*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*

VACKOVÁ, H. *Studium biologických účinků technického konopí a jeho frakcí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 54 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Hároníková, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Andree Hároníkové, Ph.D. Další informace mi poskytla prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. Uvedla jsem všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpala. Diplomová práce je majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce Ing. Andree Hároníkové, Ph.D., za odborné vedení, za ochotu, vstřícný přístup a pomoc v laboratoři. Určitě bych také ráda poděkovala prof. RNDr. Ivaně Márové, za ochotu a vstřícný přístup. Dále bych chtěla poděkovat všem z laboratoře, se kterými jsem pracovala, a za pomoc při obsluze některých přístrojů. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině a příteli za podporu.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Konopí	9
2.2	Cannabis sativa L. odrůdy.....	10
2.2.1	Finola	10
2.2.2	Fedora	10
2.2.3	Kompolti	10
2.3	Účinné látky – Kanabinoidy.....	12
2.3.1	Δ^9 -trans-tetrahydrokanabinol	13
2.3.2	Kanabidiol.....	13
2.3.3	Kanabinol.....	14
2.3.4	Kanabichromen	14
2.3.5	Kanabigerol	15
2.3.6	Kyselina kanabigerolová	15
2.4	Endogenní kanabinoidní systém.....	15
2.5	Indikace a klinické studie	17
2.5.1	Fakultní nemocnice u sv. Anny Brno	18
2.5.2	Chronická bolest.....	18
2.5.3	Roztroušená skleróza	18
2.5.4	Nevolnost	19
2.5.5	Touretteův syndrom.....	19
2.5.6	Zelený zákal	19
2.5.7	Rakovina	19
2.5.8	Epilepsie	19
2.6	Léčivé přípravky z konopí.....	19
2.6.1	Marinol	20
2.6.2	Cesamet.....	20
2.6.3	Sativex	20
2.7	Legislativa v České republice	20
2.8	Antibakteriální účinky konopí	21
2.8.1	Difúzní metody pro stanovení antimikrobiální aktivity	21
2.8.2	Diluční metody pro stanovení antimikrobiální aktivity	22
2.9	Mikroorganismy.....	22
2.9.1	Kvasinky.....	22

2.9.2	Bakterie	22
2.9.2.1	Grampozitivní bakterie	22
2.9.2.2	Gramnegativní bakterie	23
2.10	Instrumentální metody pro analýzu látek v konopí	24
2.10.1	Kapalinová chromatografie	24
2.10.2	Tenkvrstvá chromatografie	24
2.10.3	Plynová chromatografie	25
3	CÍL PRÁCE	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Použité chemikálie	26
4.1.1	Chemikálie pro stanovení flavonoidů	26
4.1.2	Chemikálie pro stanovení antioxidační aktivity	26
4.1.3	Chemikálie pro antimikrobiální testy – stanovení inhibičního účinku měřením zákalu při 630 nm, dluční test	26
4.1.4	Chemikálie pro TLC analýzu	26
4.2	Přístroje a pomůcky	26
4.3	Použité kmeny pro kultivaci	27
4.4	Příprava tinktur	27
4.5	Spektrofotometrické stanovení polyfenolů	28
4.6	Spektrofotometrické stanovení flavonoidů	28
4.7	Stanovení antioxidační aktivity	28
4.8	Stanovení antimikrobiální aktivity pomocí zákalu	28
4.9	Diskový antimikrobiální test	29
4.10	Tenkvrstvá chromatografie	29
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	30
5.1	Spektrofotometrické stanovení polyfenolů	30
5.2	Spektrofotometrické stanovení flavonoidů	32
5.3	Stanovení antioxidační aktivity	33
5.4	Stanovení antimikrobiální aktivity pomocí zákalu	35
5.4.1	Rozpad buněk	36
5.4.2	Inhibice růstu	38

5.5	Diskový antimikrobiální test	40
5.6	Tenkvrstvá chromatografie	43
6	ZÁVĚR.....	48
7	LITERATURA.....	50
8	ZKRATKY.....	54
9	PŘÍLOHY	55

1 Úvod

Konopí je jediná rostlina, která obsahuje látky zvané kanabinoidy. Patří do řádu Růžovité a čeledi Konopovitých. Jde o dvoudomou, jednoletou bylinu, která může dorůst do výšky dvou až tří metrů. Do rodu konopí jsou zahrnuty dva samostatné druhy, a to konopí indické (*Cannabis indica* Lam) a konopí seté (*Cannabis sativa* L.). Tato rostlina dostávala spoustu názvů. Číňané ji nazývali „Ma“, Indové „Ganja“, Řekové „Cannabis“, německy mluvící země „Hanf“ a v Čechách dostala název „Konopí“. Konopí provází lidstvo už od nepaměti, kdy semena byla využita jako potrava, listy pro léčbu bolesti a z vláken stonků byla vyrobena látka. V těchto dobách bylo konopí považováno za běžnou věc do té doby, než bylo vypuzeno bavlnou a zakázáno jako omamný prostředek.

Rostlina bývá velice často využívána pro léčebné účely, ale většinou populace je považována za drogu, která „zřetuje“ člověka. Jde pouze o neinformovanost populace. Ano, konopí obsahuje THC, které uvádí mozek do stavu „rauchu“, ale obsahuje také kanabinoidy, které mají veliký potenciál v léčbě. Pěstuje se konopí, které obsahuje minimum THC a více kanabinoidů, a právě takovéto rostliny bývají využity při léčbě konopím. V dnešní době je potřeba hledat nové látky, které budou mít podobný účinek jako antibiotika. Přibývá čím dál více případů rezistence vůči antibiotikům, která jsou běžně předepisována. Právě díky této rostlině by se mohla najít cesta, jak se pokusit vyřešit daný problém s rezistencí mikroorganismů vůči antibiotikům. Nejedná se ovšem jen o tento problém, konopí by bylo schopné pomoci pacientům s vážnými nemocemi, jako je epilepsie, roztroušená skleróza, rakovina atd. V některých zemích jsou pacienti léčeni pomocí konopí a tato léčba má pozitivní výsledky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Konopí

Rostlina konopí neboli *Cannabis* patří mezi konopovité (*Cannabaceae*), do řádů růžovité (*Rosales*). Rostlina je dvoudomá a jednoletá. Má velkou schopnost se adaptovat na podmínky prostředí, ve kterém je pěstována, a proto je rozšířená po celém světě. Původem pochází z Asie[1].

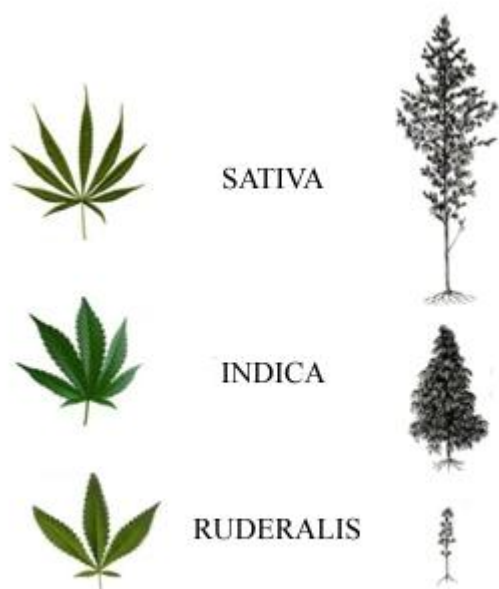
Nejvíce pěstován je druh konopí seté. Je pěstováno ze semen, nemá moc vyvinutý kořenový systém, který je tvořen hlavním kořenem, ze kterého vyrůstají postranní vlásečnicové kořínky. Stonek je dřevnatý, tvořený hemicelulózou. Listy jsou tvořeny z pěti až osmi lístků. Rozlišují se zde samčí i samičí rostliny. Samčí mají světlejší květy a tenčí stonky. Samičí mají tmavší barvu a nesou více listů. Semínko vzniká po oplození samčím pylem, může mít hnědou, černou nebo šedou barvu. Olej ze semen je bohatý na minerály, esenciální kyseliny, výživu a bílkoviny [2][3].

Existují tři hlavní druhy konopí:

Konopí indické (*Cannabis indica*): nejvíce se vyskytuje v subtropických a tropických oblastech, nejčastěji v Asii. Nejvyšší možná výška je dva metry. Má vysoký obsah THC – až 20 %.

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.): vyskytuje se v mírném klimatickém pásu. Jedná se o nejrozšířenější odrůdu konopí. Tvar rostliny je štíhlý a dosahuje až šesti metrů výšky. Obsah hlavní aktivní psychoaktivní látky THC je maximálně 5 %.

Konopí rumištní (*Cannabis ruderalis*): tento druh se vyskytuje převážně v sibiřské oblasti, jedná se spíš o plevel. Má velmi malý vzrůst [1].



Obrázek 1: Porovnání druhů konopí [4]

Indica vs. Sativa

Spousta lidí nevidí rozdíl mezi indicou a sativou, berou konopí jako konopí a rozdíl neřeší. V dnešní době se sice prohlubuje informovanost o konopí a jeho účincích, ale u velké části populace stále nedosahuje uspokojivé úrovně.

Můžeme říci, že se liší v 5 hlavních znacích:

Velikost – indica má silnější stonek a více se větví, je robustnější, ale nižší, zatímco sativa roste i ve venkovních podmínkách a dorůstá do velké výšky a větví se méně.

Účinek – indica má sedativní účinky, zatímco sativa stimuluje mozek.

Léčebné využití – indica se využívá při nespavosti a k úlevě od bolesti. Při použití sativy výhradně přes den má sativa energetizující účinek, zlepši náladu.

Sklizeň – jak již bylo zmíněno, sativa může narůst do gigantických rozměrů, ale obsahuje méně pryskyřice než indica.

Doba květu – indica dozrává během šesti týdnů až dvou měsíců a sklízí se v říjnu. Sativa roste pomaleji a později kvete, doba květu může trvat až tři měsíce [5].

2.2 Cannabis sativa L. odrůdy

2.2.1 Finola

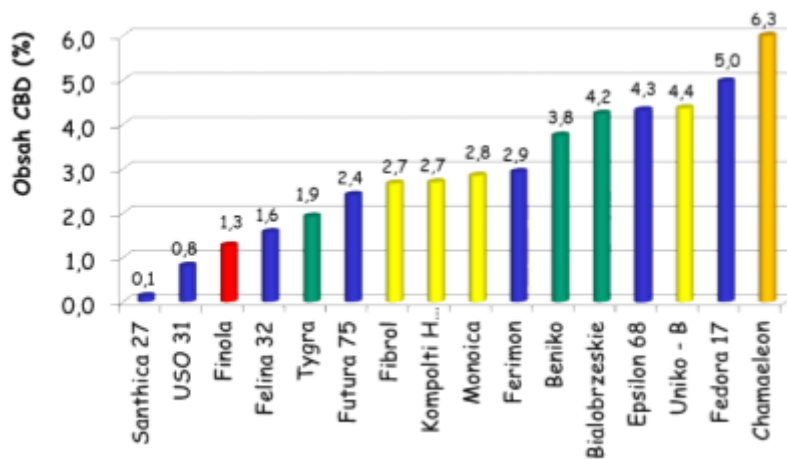
Finola je řazena mezi dvoudomé rostliny a jde o velmi ranou finskou odrůdu. Dozrává o 3 týdny až měsíc dříve, čemuž odpovídá i výška porostu. Díky extrémní ranosti je tato odrůda určena pro produkci semen. Délka stonku je krátká a celkový vzrůst málokdy přesáhne 140 cm [6].

2.2.2 Fedora

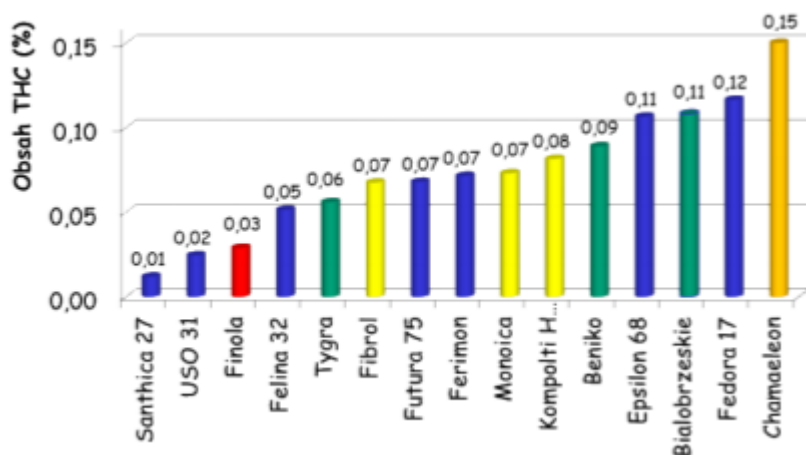
Odrůda Fedora je původem z Francie, je řazena mezi jednodomé rostliny. Její vegetační doba je krátká, ale je delší než u Finoly – přibližně o dva týdny až měsíc (záleží na klimatických podmínkách). Tato odrůda je vhodná na pěstování jak na semeno, tak i na olej. Vzrůst Fedory bývá vyšší než u Finoly, výška je od 140 cm [7].

2.2.3 Kompolti

Jedná se o nejstarší dvoudomou rostlinu, která je registrovaná v Evropě. Rostlina má jemné, barevné listy a stonek je mírně žebrovaný. Vegetační období trvá 110-115 dnů od vyklíčení v případě, že je odrůda využita na vlákno. Pokud se využívá na semena, zralosti dosahuje po 150-160 dnech od vyklíčení. Jde o vláknennou odrůdu s nejvyšším obsahem vlákniny v Evropě. Obsah THC je velmi nízký; v rozmezí 0,1-0,15% [6].



Obrázek 2: Obsah CBD v odrůdách [6]

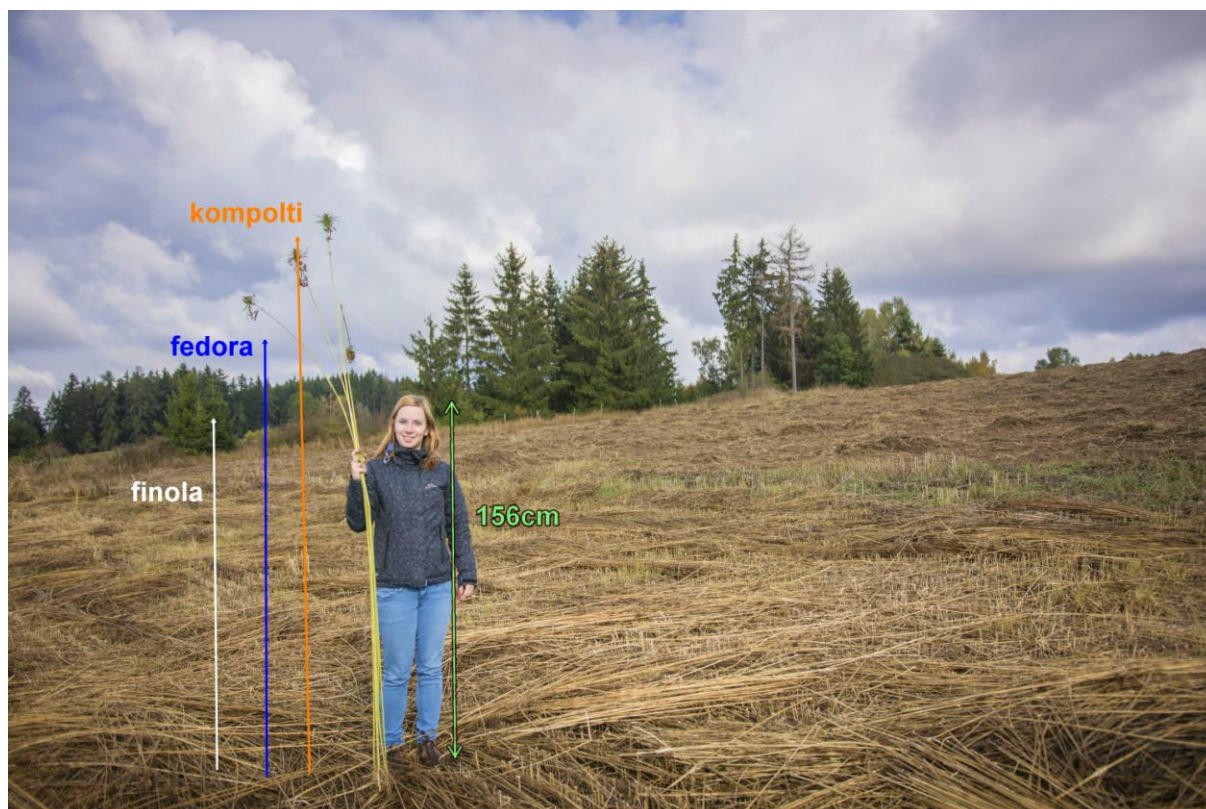


Obrázek 3: Obsah THC v konopí setém [6]

Jednotlivé odrůdy se liší obsahem kanabinoidů. Byla provedena studie [6] pro zjištění obsahu daných kanabinoidů v jednotlivých odrůdách konopí. Výsledky lze vidět na Obrázek 2 a Obrázek 3.



Obrázek 4: Porovnání velikosti květů použitých odrůd



Obrázek 5: Porovnání velikostí používaných odrůd

Jak je vidět z Obrázek 4 a Obrázek 5, Finola je vzrůstově nejmenší, ale zato má větší květy oproti dalším odrůdám. Fedora má štíhlý a užší květ. Kompolti má z uvedených odrůd nejmenší květy, ale dosahuje nejvyššího vzrůstu (až přes 2 metry).

2.3 Účinné látky – Kanabinoidy

Konopí je jediná rostlina na světě, která produkuje účinné látky zvané kanabinoidy. Ty jsou obsaženy v pryskyřici, kterou rostlina tvoří. Těchto látek bylo v rostlině izolováno na desítky, ale většina je zastoupena ve stopovém množství. Kanabinoidy jsou považovány za hlavní terapeuticky aktivní látky. Tyto látky lze i připravit synteticky. Konopí, které se pěstuje uvnitř, obsahuje díky lépe modifikovatelným podmínkám pro růst více kanabinoidů než konopí pěstované venku. Tato rostlina neobsahuje pouze kanabinoidy (ty tvoří čtvrtinu až třetinu složení), ale i éterické oleje, mastné kyseliny, steroly a uhlovodíky. Terpeny jsou látky, které mohou za charakteristickou vůni a chuť konopí. Mají vlastnosti, díky kterým se podílejí na mírnění nežádoucích účinků THC, například snižování výpadků paměti, úzkosti apod. Ale mimo tyto účinky mají terpeny také antibiotické účinky a působí analgeticky. Zastoupení terpenů v odrůdách konopí se výrazně liší. Stejně je tomu tak i u kanabinoidů. Daný poměr jejich zastoupení má ty správné jedinečné léčebné účinky[8][9]. V konopí lze nalézt také sacharidy. Z monosacharidů lze najít zastoupení fruktosu, arabinosu, galaktosu a glukosu. Za disacharidy je zde sacharosa a maltosa. Dále zde najdeme polysacharidy (celulosu, hemicelulosu, pektin) a další cukry jako například glycerol, sorbitol. V semenech rostlin lze najít i mastné kyseliny. Převládají nenasycené mastné kyseliny a nejvíce zastoupenou je kyselina linolová. Dále pak kyselina α -linoleová a kyselina olejová. V menším množství lze

nalézt i kyselinu γ -linoleovou, stearinovou a eikosanovou. V zastoupení jsou i nasycené mastné kyseliny, a to kyselina palmitová, stearová a arachidonová[9]. Konopí vytváří kanabinoidy ve formě jejich kyselin. Právě tyto kyseliny se při zahřívání přeměňují na své „neutrální“ formy procesem zvaným dekarboxylace. Kyselá forma CBD (kyselina kannabinolová CBDA) se přeměnění dekarboxylací na CBD a to funguje u všech kanabinoidů. K dekarboxylaci dochází i při přirozeném stárnutí rostliny. Kyseliny kanabinoidů nevyvolávají pocity euforie a neváží se na kanabinoidní receptory. To ale neznamená, že nemají žádný léčivý účinek. Mají své specifické vlastnosti: například kyselina tetrahydrokanabinolová (THCA) má pozitivní vliv na imunitní systém. Dalším velice zajímavým účinkem je schopnost kanabinoidů zpomalovat růst určitých typů nádorových buněk (prokázáno zatím v laboratorních testech)[8][9].

Z hlediska zastoupení kanabinoidů v rostlině můžeme rozlišit pět chemotypů podle obsahu THC a CBD.

Chemotyp I. – vysoký obsah THC a nízký CBD. Největší psychoaktivní účinek. Tyto drogy jsou nejžádanější.

Chemotyp II. – vysoký obsah CBD a střední až vysoký THC. Využití při výrobě hašiše.

Chemotyp III. – vysoký obsah CBD a nízký THC. Využití na vlákno a oleje.

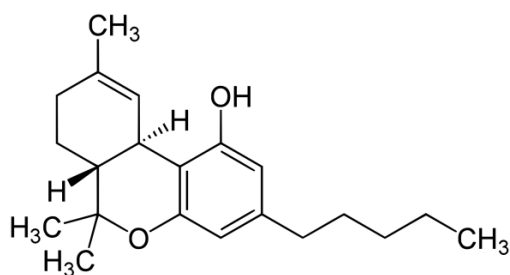
Chemotyp IV. – střední až vysoký obsah CBD i THC. Terapeutické účinky.

Chemotyp V. - nemají psychoaktivní účinky[10].

2.3.1 Δ^9 -trans-tetrahydrokanabinol

Δ^9 -trans-tetrahydrokanabinol neboli THC je psychoaktivní látkou. Lze ji najít ve všech odrůdách konopí od stopového množství po maximální množství až 95 % v sušině. Jeho psychoaktivní účinky se projevují až od obsahu 1 % THC v rostlině. V roce 1946 byla určena struktura THC [10].

Má léčebné účinky, přes navození „rauš“ je THC velkým pomocníkem při ulevování od bolesti, potlačuje svalové křeče, může zmírnit nevolnost a navodit chuť k jídlu a v neposlední řadě umí potlačit růst nádorových buněk [12]. THC působí přímo na receptory CB1 (nervový systém) a CB2 (imunitní systém).



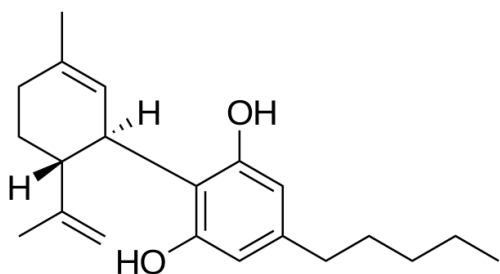
Obrázek 6: Strukturní vzorec THC [10]

2.3.2 Kanabidiol

Kanabidiol neboli CBD se vyskytuje jako THC ve všech rostlinách konopí od stopového množství až po maximální obsah 95 %. Oproti THC nemá kanabidiol psychoaktivní účinky, jedná se o nejdůležitější nepsychoaktivní látku. Je antagonistou THC (tlumí účinky THC). Má analgetické, sedativní a antibiotické vlastnosti. CBD je prekurzorem THC, což znamená, že je mezistupněm před tvorbou THC. CBDA je jednou ze základních látek konopí. Jedná se o

prekurzor CBD, proto stejně jako CBD nemá psychoaktivní účinky jako THC. Liší se od kanabidiolu tím, že má navázanou karboxylovou skupinu. Během procesu sušení dochází k dekarboxylaci kyselin a vzniká kanabidiol. Stejně jako ostatní kanabinoidy má i kyselina kanabidiolová účinky, které by se daly využít ve zdravotnictví. Umí potlačit nebo zastavit růst rakovinných buněk, může zpomalovat růst bakterií a má silné protizánětlivé účinky [10].

V roce 2007 [13] se podařilo zjistit, že CBD působí na agresivní rakovinné nádory. Inhibuje jejich gen Id-1. Za zjištění mechanismu, kterým kanabidiol zastaví gen a zabrání tak rakovinnému bujení, se zasloužili Profesor McAllister z Kalifornie a profesor Perez z Francie. Tato doba zapříčinila rozvoj zjištění využití a účinku kanabinoidů. Zjistilo se, že má antiepileptické, antiproliferační, neuroprotektivní, antipsychotické a další účinky. GW Pharmaceuticals provádí i testování léčiva obsahujícího CBD na léčbu epilepsie. Jedná se zatím o jedinou firmu, která vyrábí léky obsahující rostlinné kanabinoidy. Firma má dobré výsledky, zjistili, že by CBD mohlo snižovat počet záchvatů z deseti denně na jeden týdně [13].

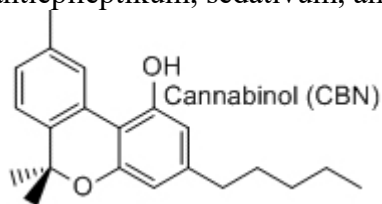


Obrázek 7: Strukturální vzorec CBD [10]

2.3.3 Kanabinol

Kanabinol (CBN) je degradačním produktem THC. Z toho vyplývá, že není běžně produkován v rostlině. Pokud je CBN v rostlině vyšší množství, to znamená menší pravděpodobnost výskytu svého prekursoru THC. V čerstvé rostlině je cannabinolu minimum, ale špatným skladováním (přímé světlo, velká vlhkost prostředí) může dojít k oxidaci THC [10].

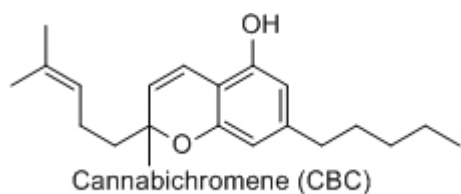
V rostlině se vyskytuje ve stopovém množství v závislosti na stáří rostliny. Působí jako antiepileptikum, sedativum, antibiotikum a protizánětlivě [11].



Obrázek 8: Strukturální vzorec CBN [14]

2.3.4 Kanabichromen

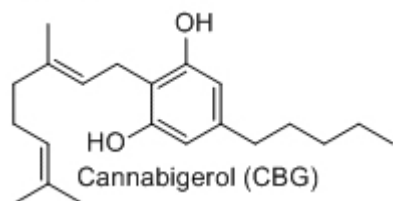
Kanabichromen (CBC) se nachází v nižších koncentracích než CBD nebo THC. Nevykazuje žádné psychoaktivní účinky, ale působí synergisticky s THC, což znamená, že zesiluje jeho účinek. Patří mezi základní kanabinoidy. Účinkuje jako antibiotikum, analgetikum, fungicidně i protizánětlivě [10].



Obrázek 9: Strukturní vzorec CBC [14]

2.3.5 Kanabigerol

Kanabigerol (ve zkratce CBG) je prekurzorem CBGA; první popsáný kanabinoid. Jeho účinky jsou antibiotické a analgetické; významný je i jeho protizánětlivý a fungicidní účinek.



Obrázek 10: Strukturní vzorec CBG [14]

2.3.6 Kyselina kanabigerolová

Většina pozornosti je směřována na THC nebo CBD, ale kyselina kanabigerolová je velice často opomíjena. Nemělo by tomu tak být, protože právě CBGA je prekurzorem všech kanabinoidů v konopí, jak lze vidět na Obrázek 11. Jak je vidět, je kyselina kanabigerolová prekurzorem pro tři hlavní kyseliny, které dekarboxylací přecházejí na kanabinoidy. Zajímavostí je, že v technickém konopí je tato kyselina spolu s jejím kananabiodem kanabigerolem ve větším zastoupení než v konopí indickém [15].



Obrázek 11: CBGA [15]

2.4 Endogenní kanabinoidní systém

Endogenní kanabinoidní systém se podílí na udržování a regulaci organismu. Endokanabinoidy si tělo vytváří samo a fytokanabinoidy jsou obsaženy v rostlinách. Jejich receptory se nacházejí po celém těle (mozku, orgánech, tkáních, imunitním systému). Kanabinoidy podporují homeostázu, příkladem tohoto procesu je například autofágie, za kterou je zodpovědný endokanabinoidní systém. Autofágie je proces, kdy buňka nechá odumřít svoji část. Jedná se o mechanismus, který pomáhá buňkám udržovat životně důležitou stabilitu mezi syntézou, degradací, následnou recyklací. Zároveň má smrtící účinek

na zhoubné nádory, kdy se buňka sama stráví. Endokanabinoidy jsou odpovědné za komunikaci a spolupráci mezi buňkami. Jako příklad můžeme uvést poraněné místo, kde právě kanabinoidy zpomalují uvolnění aktivátorů citlivosti kolem poraněné tkáně. Pomáhají tedy stabilizovat nervové tkáně v okolí a zároveň brání uvolnění zánětlivým látkám. Lze tedy říci, že působí třemi různými mechanismy a působí na tři různé typy buněk, a to vše za jediným účelem – minimalizovat bolest a poškození tkáně v místě poranění. Dá se říci, že endokanabinoidní systém tvoří jakýsi most mezi tělem a myslí, což může vysvětlit i to, jak psychika ovlivňuje naše zdraví. Regulace a udržování homeostázy není jediným úkolem endokanabinoidního systému, ale ovlivňuje i to, jaký vztah má člověk ke svému okolí. Podporují změnu pevně fixovaného myšlení a chování, které vychází z předešlých zkušeností. Pomáhají tak přizpůsobovat se neustále se měnícímu okolí bez negativního vlivu na zdraví [16].

Buňky komunikují prostřednictvím receptorů. Molekuly, které se vážou s receptory, jsou ligandy. Po navázání ligandu na receptor dojde ke změně, nastavení receptoru. Takto se do buňky dostane signál, který ji nutí specificky reagovat. Spustí se tedy určitý proces, který je svázán s daným receptorem. Buňka začne růst (hojení ran), spáchá sebevraždu (vytvoření místa pro jiné buňky), umožní transport přes membránu atd. Právě tímto způsobem prostřednictvím receptorů funguje většina syntetických léčiv [9].

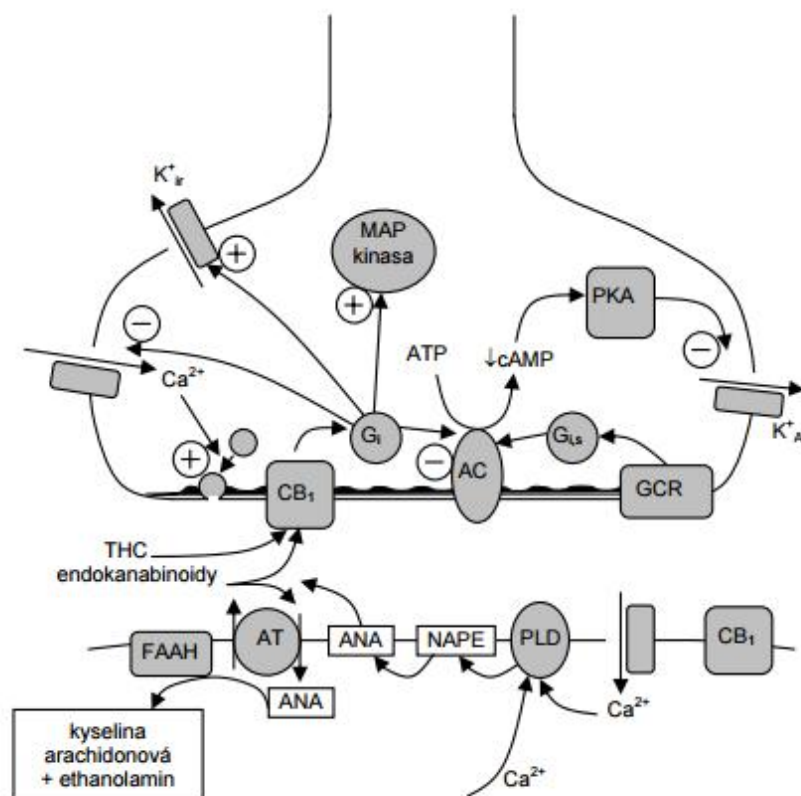
Jedná se o signální systém, díky kterému je umožněna komunikace s buňkami, které jsou navázány do systému. Jak už název napovídá, systém je tvořen kanabinoidními receptory CB₁ a CB₂, endogenními ligandy a enzymy, které slouží k degradaci a biosyntéze. CB₁ receptory se vyskytují v nervové soustavě, tkáních, žlázách a orgánech, zatímco CB₂ receptory se vyskytují v imunitním systému.

Na receptor CB₁ se váží specifické ligandy, například anandamid, 2-AG, noladin ether, látky podobné eikosanoidům [17]. Tyto receptory nalezneme například v srdci, kde mají důležitou funkci, jako je vazodilatace, endoteliální růst apod., dokonce se podílí na kontrole energetického metabolismu. Nadměrná stimulace CB₁ receptorů vede k pocitům intoxikace (pocit tzv. „zkouření“).

Receptory CB₂ jsou produkovány imunitním systémem a nachází se v centrální nervové soustavě, mohou tedy ovlivnit i příjem potravy [18].

Receptory působí přes Gprotein. Nevytváří se v těle zásoby endokanabinoidů, vznikají pouze na nějaký podnět, například patologický nebo fyziologický, který spustí syntézu endokanabinoidů [19].

Endokanabinoidy jsou lipofilní molekuly vznikající z fosfolipidů v membránách. Pro fungování endokanabinoidů je potřeba zvýšené nitrobuněčné koncentrace Ca²⁺, čehož se dosáhne buď uvolněním z nitrobuněčných zásob, nebo přes iontové kanály receptorů. Tím se spustí aktivace fosfolipáz a hydroláz, dochází k hydrolýze membránových lipidů a postupnému uvolnění endokanabinoidů. Endokanabinoidy společně se syntetickými i fyto-kanabinoidy aktivují receptor CB₁. CB₁ jsou spřaženy s G proteiny. Reakce snižují produkci cyklického adenosinmonofosfátu a dochází k utlumení calciových kanálků, tím dochází k menší produkci neurotransmiterů a zvýší se produkce draselných iontů. Jednou z hlavních funkcí kanabinoidů je potlačit produkci kyseliny gamaaminomáselné, jejíž potlačení má vliv na uvolnění dalších neurotransmiterů [20].



Obrázek 12: Mechanismus působení kanabinoidů [21]

Nesmíme ale zapomínat na terpeny, které pomáhají kanabinoidům při průchodu z krevního řečiště do mozku a ovlivňují jejich navázání na receptory. Z dosavadních studií je zřejmé, že rostlinné preparáty mají často lepší výsledky než syntetické. Tento signální systém je přítomný téměř ve všech formách života. Od lidí přes psy, ptáky, ryby a dokonce i primitivní živočichy (nezmar) obsahují endokanabinoidní systém, což dokazuje i význam endokanabinoidního systému v evoluci [9].

2.5 Indikace a klinické studie

Velice těžká je cesta k tomu získat informace o účincích konopí i přes dnešní dorozumívací techniky. Lékaři mnohdy nevědí ani o existenci endokanabinoidního systému a školení ohledně účinku kanabinoidů nebývá moc časté. Jsou provozovány randomizované dvojité zaslepené klinické studie, ale jsou finančně i časové náročné. Tyto studie jsou zaměřené spíše na izolované kanabinoidy než na celkovou rostlinu. Proto je využíván například lék Marinol, který je vlastně syntetickým THC. Jednoduché není ani získat povolení na provádění takovýchto testů a mnohdy se dalším úskalím stává získat povolení na konopný výzkum. Z klinických studií, do kterých bylo zahrnuto více než 9,000 pacientů, víme, že kanabinoidy vykazují velký potenciál zejména jako analgetika. Za jeden z nejvýznamnějších objevů je považován účinek kanabinoidů na rakovinu, a to ne v rámci zmírňování příznaků této nemoci, ale zastavení množení nádorových buněk. V nedávných letech se ukázaly dobré výsledky i při léčbě HIV/AIDS [21][22][23][24].

2.5.1 Fakultní nemocnice u sv. Anny Brno

MUDr. Radovan Hřib z Centra pro léčbu bolesti FNUSA uvádí, že své pacienty léčí pomocí medicínského konopí. Počet jeho pacientů je cca 70 osob, další pacienti se o tuto možnost léčby hlásí. Jedná se o pacienty, kteří trpí chronickou, neuropatickou bolestí. Před samotným začátkem si nastudoval informace ohledně této léčby. Možnost předepisovat konopí pacientům prý není nikterak složitá, samotný proces, než se vyřeší veškeré podklady, zabere 1 týden času. K léčbě využívá konopí o obsahu 19 % THC a 1 % CBD, je to jediná odrůda, která je dostupná v České republice pro léčbu. Doufá, že časem dojde k posunu a k dispozici bude více odrůd s různým poměrem THC a CBD. Pacientům podává léky ve formě tobolek, ale využívá i valorizaci. V tobolce je 0,125 mg konopných květů (tuto hodnotu si v průběhu léčby stanovil jako ideální dávku v poměru úlevy od bolesti a minimálním ovlivněním vědomí). Předem upozorňuje pacienty na možnost nežádoucích účinků a upozorňuje, že ovlivnění vědomí přechází po pár dnech užívání. Zkoušel podávat lék formou čokolády, kdy zahřáli 50 g čokolády na vaření na 130 °C, do které byl přidán 1 g konopí. Vše bylo rozetřeno na papír a po zchladnutí koláček rozdělili na čtvrtiny. Tímto způsobem ovšem nebylo možné hlídat správnou dávku, proto využívá léčbu pomocí tobolek. Doktor Hřib navštívil i toxikologické informační středisko, kde zjišťoval letální dávku THC. Tato informace zatím není známá, doposud nedošlo k intoxikaci pomocí THC. Tím získal bezpečnost, že se pacienti sami nemohou předávkovat. Využil i vlastní výpočty letální dávky, které ukázaly, že by člověk musel sníst do jedné hodiny 7 kg sušených květů konopí. U pacientů pozoruje pozitivní změny. Pro podrobnější informace nabízí publikaci, která je volně dostupná na internetu. Její název je *Přehled současných znalostí o léčebných účincích konopí a přípravků z něj a jeho perspektiv*, autory jsou Zábranský a Hanuš [25].

2.5.2 Chronická bolest

Známe hodně druhů bolesti, ale největší léčivé účinky jsou zachyceny při neuropatické bolesti, u které je zdrojem narušení nebo porucha nervů, zatímco u akutní bolesti nebyla pozorována žádná úleva, což je pravděpodobně způsobeno opět endokanabinoidním systémem a jeho reakcí na různé typy bolesti. Z provedených klinických studií vyplývá, že pacienti dávají přednost raději účinkům kanabinoidů než vysokým dávkám opiátů. Jak je známo, chronická bolest je velice těžko léčena pomocí jednoho druhu léčiva. Využívá se proto kombinace kanabinoidů společně s opiáty. Tyto dvě látky působí společně a dochází k znásobení účinku. Proto je možné dávat menší dávky opiátů v kombinaci s kanabinoidy a tím snížit i nežádoucí účinky vysokých dávek opiátů [21][22][23].

2.5.3 Roztroušená skleróza

Největší počet klinických studií byl prozatím věnován právě roztroušené skleróze a účinku kanabinoidů. Je prokázáno, že konopí tlumí bolesti spojené právě s touto nemocí a dále i ovlivňuje třes a svalové křeče. Nelze se tedy divit tomu, že mnoho pacientů vyhledává konopí jako možnost léčby k lékům, které užívají, ale mají velké nežádoucí účinky. Pacient, který užívá konopí, podotýká, že jeho spánek je lepší a delší. Právě roztroušená skleróza byla diagnózou, u které byly provedeny první klinické studie s kanabinoidním přípravkem s názvem Sativex. Z klinických studií vyplývá, že v průběhu delšího časově náročného léčení nedochází k potřebě zvyšovat dávku podávaného léku s kanabinoidy [21][22][23].

2.5.4 Nevolnost

U pacientů se žloutenkou typu C či pacientů s HIV/AIDS bylo zaznamenáno mírnění příznaků, jako jsou nevolnost a zvracení v důsledku užívání kanabinoidů. Od roku 1986 je povoleno užívat lék Marinol, což je syntetické THC. Bylo zjištěno, že je lepší využít konopí jako celek s dalšími kanabinoidy, které se navzájem ovlivňují. Kanabinoidy navozují zvýšení chuti k jídlu, což může být podstatné při onemocněních, kde dochází k hubnutí, chřadnutí. Konopí je výhodnější z důvodu způsobu podání léčiva. Marinol je tabletky, která ještě podráždí už podrážděný žaludek a musí se podat orálně, ale konopí lze podat inhalačně a při tomto způsobu podání je dokázán i rychlejší nástup účinku [21][22][23].

2.5.5 Touretteův syndrom

Jedná se o vrozenou nemoc, která se projevuje motorickými i zvukovými tiky. Vědeckými studiemi bylo prokázáno, že konopí působí na tlumení těchto tiků a zároveň ovlivňuje poruchy chování při tomto onemocnění. Bylo zkoumáno samotné THC a jeho vliv na Touretteův syndrom. Potvrdilo se zmírnění tiků bez vážnějších vedlejších účinků [21][22][23].

2.5.6 Zelený zákal

Ovlivnění této nemoci konopím bylo sledováno již v 70. letech podáváním formou inhalováním či orálně. Bylo prokázáno, že konopí má vliv na snížení nitroočního tlaku, tak jako léčiva běžně používaná. Snížení nitroočního tlaku nastává časově v rámci několika hodin, je důležité podávat konopí v pravidelných intervalech [21][22][23].

2.5.7 Rakovina

Konopí pomáhá k zastavení růstu nádorových buněk. Provedly se klinické studie na zvířatech i na izolovaných nádorových buňkách. Pomocí těchto studií byla prokázána aktivita ve formě zastavení nebo zpomalení růstu nádorových buněk. To vše je ještě ve stádiu testování a nic není považováno za spolehlivý důkaz při léčbě této nemoci [21][22][23].

2.5.8 Epilepsie

Dosavadní léčba epilepsie umožní relativně zvládat samotné příznaky, avšak spousta pacientů nemá stále nad záchvaty dostatečnou kontrolu. V roce 1979 byly provedeny studie na potkanech za využití CBD. Do dalších pokusů byli zahrnuti i lidé. U kanabidiolu byla prokázána schopnost snížit frekvenci i intenzitu epileptických příznaků. Pokud se vezme v potaz to, že kanabidiol nemá psychoaktivní účinky, je žhavým kandidátem pro léčbu epilepsie [21][22][23].

2.6 Léčivé přípravky z konopí

Některé země mají povolenou legální léčbu za využití konopí. Můžeme se tady potkat s názvy přípravků jako například dronabinol (Marinol) či nabilon (Cesamet). Jedná se o přípravky, které jsou vyrobeny synteticky, jejich používání je povolené v Kanadě a USA. Jako přírodní extrakt z konopí setého je využíván Sativex, který je povolen také v Kanadě a USA [26][27][28].

2.6.1 Marinol

Jde o kanabinoid zvaný dronabinol, jeho chemický název je (6aR,10aR)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol. Marinol je žlutý olej, je lepkavý při pokojové teplotě, ale za chladna tuhne. Tento lék je využíván k léčbě anorexie, kde dochází k poruše příjmu potravy a úbytku váhy pacienta. Používá se i při léčbě AIDS, nevolností, které bývají následkem chemoterapie. Při užívání musí být pacient pod dohledem lékaře. Samozřejmě, že lék má nežádoucí účinky, jako jsou nevolnost, bolesti břicha, zvracení, ospalost apod., ale i přes tyto nežádoucí účinky převládají stále ty pozitivní [26].

2.6.2 Cesamet

Cesamet je, stejně jako Marinol, synteticky vyrobený kanabinoid. Jsou potvrzeny účinky nabinolu na centrální nervovou soustavu a je využíván pro léčbu nevolností, bolestí břicha a zvracení. Lék je určen pro pacienty po chemoterapii. Při dlouhodobém užívání může dojít ke změně duševního stavu, proto je Cesamet podáván pacientovi jen po nezbytně nutnou dobu. Tento lék může být i zneužíván právě pro jeho účinky, které jsou identické s účinky marihuany, jako je stav euforie, halucinace apod. [27].

2.6.3 Sativex

Tento lék je oproti předchozím rozdílný jak z hlediska lékové formy, tak i z hlediska výroby léku. Sativex je podáván ve formě perorálního spreje. Lék je vyráběn louhováním dvou druhů rostlin. Jeden druh je šlechtěn na vysoký obsah CBD a druhý druh na vysoký obsah THC. Samozřejmě, že v průběhu louhování se do léčivého přípravku dostávají i jiné kanabinoidy, protože v rostlině konopí se vyskytují i další, i když v minimálním množství. To je nejzásadnější rozdíl oproti předchozím lékům. Může zde docházet k působení jednotlivých kanabinoidů, které si jsou navzájem antagonisty, a právě proto má lék Sativex méně nežádoucích účinků než předchozí léčivé přípravky. Z nežádoucích účinků se jedná o sníženou chuť k jídlu, únava a závratě, ale tyto účinky trvaly několik dní, poté odezněly. Lék je určen převážně k léčbě roztroušené sklerózy [28].

2.7 Legislativa v České republice

Dle § 29 zákona č. 167/1998 Sb. legální pěstování konopí s obsahem THC v dospělé rostlině nejvíce 0,3 % k průmyslovým nebo zahradnickým účelům do plochy o výměře 100 m². S obsahem THC v dospělé rostlině více jak 0,3 % je pěstování zakázáno dle § 24 odst. 1 písm.

a) zákona č. 167/1998 Sb.[29]

Pokud dojde k pěstování konopí o obsahu THC více jak 0,3 % a pěstitel má více jak 5 rostlin s takovýmto obsahem, jedná se o trestný čin (Dle § 285 zákona č. 40/2009 Sb., ve spojení s § 1 přílohou č. 1 nařízení vlády č. 455/2009 Sb.). Pěstitel může dostat trest až 5 let odnětí svobody. Má-li pěstitel rostlin méně než 5, jde pouze o přestupek dle § 36 odst. 1 písm. x) zákona č. 167/1998 Sb.[29].

Léčba konopím v České republice byla povolena, ale pacienti si mohou konopí zakoupit pouze v určených lékárnách, které mají tento prodej povoleny. Lékáren je ale velice málo. Konopí do lékáren dodává firma Elkoplast Slušovice s.r.o, ale bohužel firma není schopna dodržet závazky a dodat požadované konopí, takže pacienti mohou v lékárnách zakoupit konopí z první dodávky, která byla uskutečněna v březnu 2016. Tomuto konopí vypršela spotřební lhůta koncem ledna 2017. Jedná se o konopí Cannabis sativa L., které obsahuje 19 % THC a méně než 1 % CBD. Státní úřad pro kontrolu léčiv vypsál novou veřejnou

zakázku a hledá nového dodavatele konopí. Léčebné konopí může předepsat lékař, který má způsobilost k předpisu, jedná se přibližně o 20 lékařů v rámci České republiky, ale předpokládá se, že jejich počet bude narůstat [30].

2.8 Antibakteriální účinky konopí

Antimikrobiální aktivita znamená zastavení nebo potlačení růstu mikroorganismu. Určuje se zde minimální inhibiční koncentrace (určuje minimální inhibiční koncentraci antibiotika bez přítomnosti imunitního systému na kultivační půdě) a minimální baktericidní koncentrace (způsobí smrt mikroorganismu) [31].

V roce 1950 byly testovány přípravky z *Cannabis sativa* pro jejich vysoce antiseptický účinek pro léčbu ústní dutiny a kůže. V této době se teprve začala rozvíjet fytochemie. Antibakteriální účinky byly zjištěny u nepsychoaktivních kanabinoidů CBC, CBG a pro známý psychoaktivní kanabinoid THC. V současné době existují kmeny bakterií, které vykazují rezistenci vůči antibiotikům, to jsou například *Staphylococcus aureus* a v poslední době i *Mycobacterium tuberculosis*, což dokazuje, že by bylo vhodné najít nové antibakteriální látky [32].

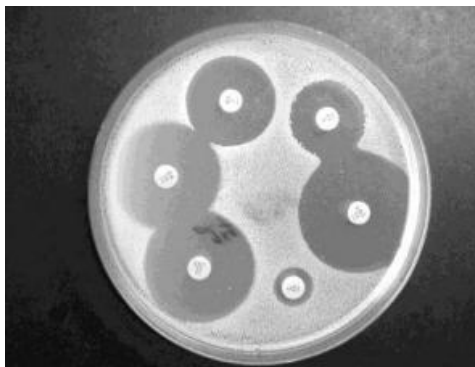
Ve svém výzkumu v roce 2008 Giovanni Appendino a Simon Gibbons zjistili, že pět typů kanabinoidů účinně zabíjí šest různých kmenů MRSA. Dále určili, že kanabinoidy s antibakteriálními účinky nemají psychoaktivní účinek [33].

Bylo zjištěno, že konopí při zánětlivých onemocněních má silnější protizánětlivé účinky než aspirin [34].

Olej ze semen z rostliny *Cannabis sativa* L. byl testován na antimikrobiální účinky proti dvěma grampozitivním organismům (*Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*), dvěma gramnegativním (*Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*) a dvěma houbám (*Aspergillus niger* a *Candida albicans*). Proti houbám nebyla prokázána antimikrobiální aktivita, ale u grampozitivních i gramnegativních tato aktivita potvrzena byla [35].

2.8.1 Difúzní metody pro stanovení antimikrobiální aktivity

Metody tohoto typu jsou velice často využívány, jsou jednoduché a rychlé. Princip metody je difúze antibakteriální látky ze zdroje do okolí. Difúzní metody se provádějí na pevných půdách, na kterých jsou naočkované mikroorganismy. Metodou lze zjistit koncentrace antimikrobiální látky, která je účinná pro daný mikroorganismus [36].

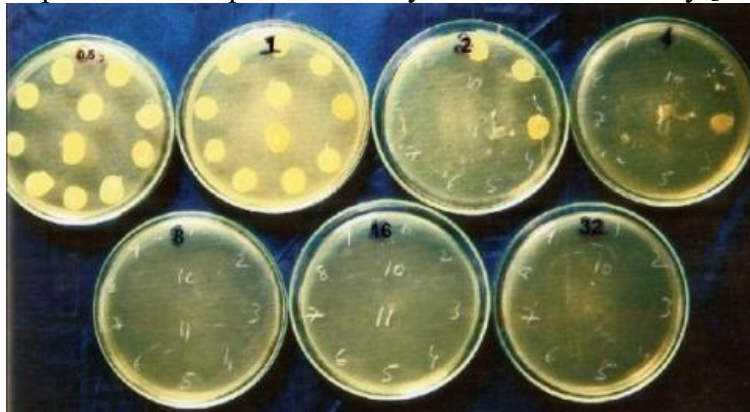


Obrázek 13: Difúzní antibakteriální test [37]

2.8.2 Diluční metody pro stanovení antimikrobiální aktivity

Tyto metody je vhodné použít pro určení minimální účinné koncentrace, která inhibuje růst mikroorganismu. Poskytují tak přesnější informace. Metoda funguje na přidání přesného množství testované látky do kultivačního média (lze provádět na pevném i tekutém médiu). Po zaočkování je sledován růst mikroorganismu [38].

Stanovení se provádí na agarových nebo bujonových půdách, v kterých je obsaženo zvolené antibiotikum v různých koncentracích. Agarová diluční metoda je referenční metodou, využívá se pro ověření spolehlivosti dalších metod. Stanovení minimální inhibiční koncentrace je důležité pro určení terapeutické dávky antimikrobiální látky [38].



Obrázek 14: Agarózová diluční metoda [39]

2.9 Mikroorganismy

2.9.1 Kvasinky

Jsou to eukaryotní mikroorganismy, které jsou velice často využívány v potravinářství a biotechnologiích. Tvarově se podobají citrónu, trojúhelníku či válci. Rozmnožování mají buď vegetativní, nebo pohlavní. Jejich buňku tvoří buněčná stěna, cytoplazmatická membrána s cytoplazmou a další buněčné struktury [40]. Buněčná stěna kvasinek není do detailu známá. Existují předpoklady, že se jedná o tři vrstvy. Vnitřní je tvořena glukánem, který pomáhá udržet tvar buňky. Vnější vrstva má za úkol regulovat propustnost [41].

Candida glabrata je kvasinkou, která byla považována za nepatogenní. V poslední době se ukazuje, že jedinci s oslabenou imunitou mívají problém s kvasinkami, které způsobují problémy v močových cestách nebo povrchové infekce. Pro léčbu onemocnění způsobených kvasinkou *Candida glabrata* se využívá antifungicidní léčivo Clotrimazol [42].

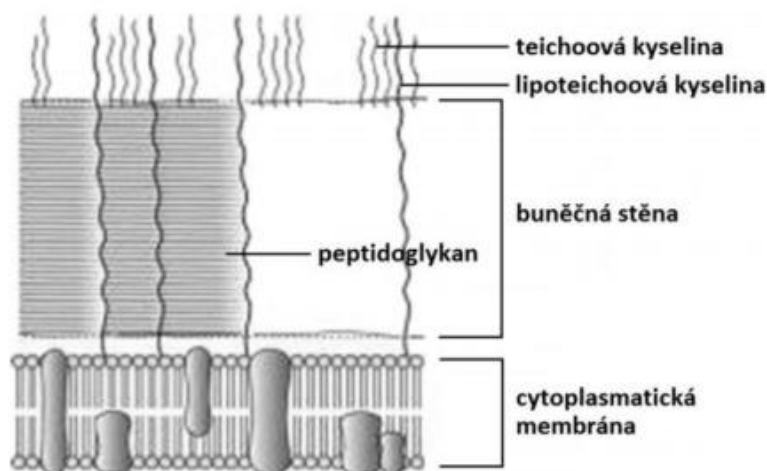
2.9.2 Bakterie

Patří mezi prokaryotní organismy, které se svou stavbou výrazně liší od eukaryotních. Do prokaryot patří dvě domény organismů, a to doména *Archaea* a doména *Bacteria*. Bakteriální buňka je menší než eukaryotní. Velikost se pohybuje od desetin μm po několik desítek μm . Tvar bakterií je protáhlý – tyčinky, nebo kulovitý – koky [38].

2.9.2.1 Grampozitivní bakterie

Tvar grampozitivních bakterií je kulovitý, tyčinkovitý nebo vláknitý. Rozmnožují se převážně příčným dělením, mohou tvořit spory. Některé z nich tvoří i endospory, což jsou klidová stadia. Stavba jejich buněčné stěny je méně náročná než u gramnegativních bakterií, ale zase je silnější. Je tvořena silnou vrstvou peptidoglykenu. U gramnegativních bakterií je

peptidoglyken mnohem více sesíťován příčnými peptanpeptidovými můstky. Grampozitivní bakterie nemají ve své buněčné stěně lipidy ani proteiny [38].



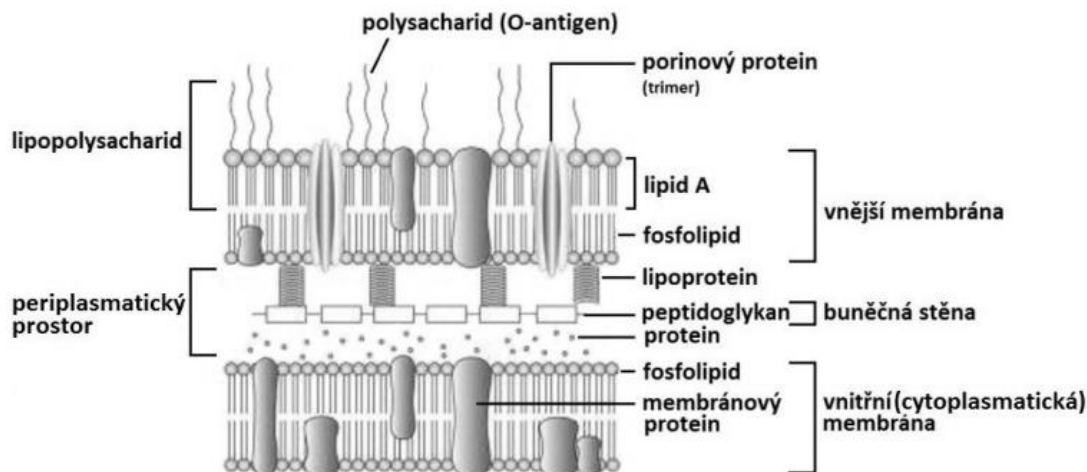
Obrázek 15: Buněčná stěna grampozitivních bakterií [38]

Do grampozitivních bakterií se řadí zástupci: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*, *Streptomyces gryseus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Micrococcus luteus*.

Micrococcus luteus je řazen mezi grampozitivní bakterie. Jedná se o koky, které bývají uspořádány do shluků buněk. Rod *Micrococcus* je striktně aerobním rodem. Vyskytuje se v půdě, vzduchu, vodě, na kůži. U lidí tato bakterie kolonizuje hltan, ústní dutinu a kůži, k infekci dochází pouze u lidí s oslabenou imunitou [43].

2.9.2.2 Gramnegativní bakterie

Gramnegativní bakterie mají většinou tvar kulatý, oválný, tyčinkovitý nebo mohou tvořit šroubovice i vlákna. Mohou tvořit i pouzdra. Rozmnožují se příčným dělením. Jejich buněčná stěna je sice tenčí než u grampozitivních bakterií, ale má složitější stavbu. Nad vrstvou peptidoglykanu je vnější membrána. Tato membrána umožňuje prostup živin, ale zabraňuje průniku řady molekul, které se běžně dostanou do grampozitivních bakterií, např. antibiotika, barviva. Mají sice buněčnou stěnu křehčí, ale zato odolnější chemicky díky obsahu lipopolysacharidů [38].



Obrázek 16: Buněčná stěna gramnegativních bakterií [38]

Jako zástupce gramnegativních bakterií bych uvedla *Borrelia burgdorferi*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium* atd.

Serratia marcescens se vyskytují v půdě nebo vodě. U člověka mohou způsobit infekci pouze u lidí s oslabenou imunitou. Mohou způsobit zánět plic, zánět močových cest. Projevují citlivost na antibiotika, jako jsou cefalosporiny 3. generace, aminoglykosidy [43].

2.10 Instrumentální metody pro analýzu látek v konopí

Stanovení látek v konopí není jednoduchou záležitostí, je potřeba využít náročných metod pro izolaci kanabinoidů i pro jejich stanovení. Zpravidla je lepší kombinovat více metod pro určení správných výsledků. Instrumentální metody využíváme především k identifikaci nebo třídění dané rostliny například podle typu vlákna, obsahu THC atd. Konopí má složité chemické složení, proto k jeho analýze využíváme složitější analytické metody. Pro tuto analýzu se nejčastěji využívá plynová i kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Dále pro screeningové testování je využívána chromatografie na tenké vrstvě [44].

2.10.1 Kapalinová chromatografie

Využití této metody ke stanovení kanabinoidů je velice náročný proces. Příprava a jejich izolace z květů konopí je složitý proces z hlediska času i technologie[45][46][47].

Feroli a kol. popisují složitou přípravu samotného vzorku. V přípravě vzorku se využívá centrifugace v rozpouštědle petroletheru. Extrakce je prováděna třikrát, supernatant se prořefitruje přes mikrofilm. Takto připravený extrakt je následně odpařen pod proudem dusíku a rozpuštěn v acetonitrilu. Takto připravený vzorek je vstřikován na kolonu [45]

Zoller a kol. se zabývá přípravou vzorku pouze louhováním rostliny v rozpouštědle metanol-dichlormethan po dobu 15 min a následného použití metanolu [46].

Arno Hazekamp a kol. uvádí, že k extrakci kanabinoidů využili trojnásobnou maceraci v n-hexanolu po dobu několika hodin. Každou extrakci započali několikaminutovým zpracováním vzorku za využití ultrazvuku. Konečnou fází bylo přefiltrování přes skleněný filtr. Kyselé kanabinoidy izolovali promýváním NaOH, dokud měl eluát tmavě oranžovou barvu. Neutrální kanabinoidy byly eluovány ethanolem a poté hexanem [47].

2.10.2 Tenkovrstvá chromatografie

Arno Hazekamp se věnuje dlouhodobě studiu konopí a kanabinoidů. Jako výhodu tenkovrstvé chromatografie vidí Hazekamp v tom, že analýza je provedena v relativně krátkém čase a lze ji provádět za použití více vzorků současně. I přes velmi časté využívání tenkovrstvé chromatografie není možné získat identifikaci všech kanabinoidů ze směsi. Pro jejich analýzu využívá dva systémy, a to polární a nepolární. Používá silikagelovou destičku F254, na kterou nanáší vzorky připravené v ethanolu. Jako vyvíjecí činidlo pro nepolární kanabinoidy bylo použito 5% methanol s kyselinou octovou v poměru 19:1, u polárních byl použit chloroform a methanol taktéž v poměru 19:1. Vyvíjení bylo ukončeno přibližně po 15 minutách. Vyhodnocení probíhalo pod UV světlem při 254 nm. Výsledky Hazekampa jsou znázorněny v Tabulka 1.

Tabulka 1: Výsledky TLC Rf faktory kanabinoidů převzato od Arno Hazekamp [48]

Nepolární TLC systém			Polární TLC systém	
Barva	Kanabinoid	Rf faktor	Kanabinoid	Rf faktor
Červená	CBDA	0,68	Δ^9 THC	0,65
Hnědá	CBGA	0,67	CBD	0,64
Oranžovo-hnědá	CBG	0,59	CBN	0,62
Červeno-hnědá	CBD	0,58	CBG	0,61
Fialová	CBN	0,48	CBC	0,58
Červená	Δ^9 THC	0,44	THCA	0,39
Červená	THCA	0,4	CBDA	0,37
Fialová	CBC	0,37	CBGA	0,31
Fialová	CBCA	0,35	CBCA	0,25

Závěrem lze říci, že tenkovrstvá chromatografie je velice užitečná metoda pro rychlou analýzu vzorků pro stanovení kanabinoidů. Touto metodou lze analyzovat pouze sušené části rostlin, a to proto, že v čerstvých rostlinách nalezneme pouze kyseliny kanabinoidů (THCA, CBDA atd.), zatímco v usušené formě lze identifikovat samotné kanabinoidy. Jak už je napsáno výše, analýza kanabinoidů je velice náročný proces, je zapotřebí kombinovat více analytických metod, abychom dostali uspokojivé výsledky. Samotná analýza je časově i finančně náročná [48].

Doktor Tomíček využívá pro stanovení kanabinoidů metodou tenkovrstvé chromatografie jiná rozpouštědla i mobilní fázi. Při jeho analýzách je využíváno 10 g sušených květů konopí, které jsou rozmělněny a následně proběhne dvakrát extrakce ve 100 ml hexanu. Oba extrakty jsou přefiltrovány a ponechány při 50 °C pro odpaření rozpouštědla. Poté se odparek rozpustí v 1 ml ethanolu. Na analýzu jsou použity skleněné destičky a mobilní fází je zde toluen. Pro detekci se využívá 0,5% roztok Fast Blue, po uschnutí je destička postříkána ještě 0,1 M NaOH, detekce se provádí pod UV světlem [49].

2.10.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je jednou z nejcitlivějších metod, díky které lze prokázat přítomnost nebo nepřítomnost THC.

K přípravě extraktu je využíván 1 g sušených květů, který je extrahován ve 100 ml n – hexanu tři hodiny na míchačce. Z takto připraveného extraktu je 100 μ l odpipetováno do vialky, dusíkem je odpařen n – hexan a k takto připravenému vzorku je přidán 1 ml methanolu. Takto připravený vzorek je vhodný pro nástřik na kolonu. U vzorků, které nebývají předem derivatizovány, dochází vlivem teploty k dekarboxylaci a kyselé formy kanabinoidů se mění na neutrální formy. Derivatizaci lze provést silylací či vytvořením alkylkarbonátu [50].

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo provést charakterizaci rostlin, které byly k dispozici, dále provést analýzu aktivních složek obsažených v technickém konopí a testování biologických účinků extraktů připravených z konopí.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie pro stanovení flavonoidů

- Ethanol-p.a., LachNer, (ČR)
- Chlorid hlinitý- p.a., LachNer, (ČR)
- Dusitan sodný-p.a., LachNer, (ČR)
- Hydroxid sodný-p.a., LachNer, (ČR)
- Uhličitan sodný-p.a., LachNer, (ČR)
- Katechin-Sigma-Aldrich, (SNR)
- Kyselina gallová-Sigma-Aldrich, (SNR)
- Folin-ciocalteau činidlo-p.a., LachNer, (ČR)

4.1.2 Chemikálie pro stanovení antioxidační aktivity

- Peroxodisíran draselný-Sigma-Aldrich, (SNR)
- Ethanol-p.a., LachNer, (ČR)
- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfuric acid)diammonium salt) - Sigma-Aldrich (SRN)
- Troxol-Sigma-Aldrich, (SNR)

4.1.3 Chemikálie pro antimikrobiální testy – stanovení inhibičního účinku měřením zákalu při 630 nm, diluční test

- Glukóza- p.a., LachNer, (ČR)
- Pepton- Himedia (India)
- Agar- Himedia (India)
- Nutrient Broth, Himedia

4.1.4 Chemikálie pro TLC analýzu

- TLC silikagel 60 RP-18 F_{254S} – Sigma Aldrich, (SNR)

Standardy:

- Cannabichromene solution – Sigma Aldrich C-143-1ML, (SNR)
- Cannabigerol solution – sigma Aldrich C-141-1ML, (SNR)
- Cannabinol solution C-I – Sigma Aldrich C-0046-1ML, (SNR)
- Cannabidiol solution – Sigma Aldrich – C-6395-1ML, (SNR)
- Methanol – VWR Chemicals for HPLC
- Kyselina octová 99,8% p.a. – LachNer, (ČR)

Vizualizace:

- Fast Blue B Salt – Sigma – Aldrich, (SNR)

4.2 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Boeco (SRN)
- IMPLEN Nanophotometer UV-VIS
- Flow box Aura mini, Bio Air Instruments(USA)

- ELISA ReaderBio Tek ELx808

4.3 Použité kmeny pro kultivaci

Candida glabrata CCM 8270

Micrococcus luteus CCM1569

Serratia marcescens CCM8587

4.4 Příprava tinktur

Konopí bylo pěstováno na poli v Kostelní Myslové. Byly sklizeny tři odrůdy. Odrůda Finola byla sklizena 4. září, Fedora 11. září a Kompolti 9. října 2016. Rostlina byla sklizena vcelku, poté byla rozstříhána na květy a stonek (viz Obrázek 17). Byly připraveny tinktury do 60 % ethanolu (dle [52]), jak z květu, tak ze stonku ve třech poměrech (1:20; 2:20; 3:20), viz Obrázek 18. Rostliny byly dále sušeny dvěma metodami, a to v sušárně při 40 °C a sušení na vzduchu při laboratorní teplotě v místnosti bez přímého slunce. Opět byly připraveny tinktury a proběhlo stanovení celkové charakteristiky rostliny.



Obrázek 17: Zpracování nasbíraného materiálu odrůda Finola



Obrázek 18: Příprava tinktur odrůdy Fedora

Na Obrázek 18 můžeme vidět, jak se mění barva v době louhování. V prvním dni louhování je barva světle zelená, zatímco po dvou týdnech louhování je barva spíše dohněda.

4.5 Spektrofotometrické stanovení polyfenolů

Do zkumavky k 1 ml zředěného v poměru 1:9 Folin-ciocalteauovu činidlu byl, přidán 1 ml destilované vody a 50 μ l vzorku. Směs byla promíchána a po 5 minutách byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Směs byla promíchána a ponechána 15 minut stát. Poté byla změřena absorbance při 750 nm. Kalibrační roztok kyseliny gallové byl v koncentračním rozmezí 0,1-0,5 mg/ml.

4.6 Spektrofotometrické stanovení flavonoidů

Do zkumavky bylo nepipetováno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml NaNO₂. Směs byla promíchána a ponechána 5 minut stát. Bylo přidáno 0,2 ml AlCl₃ a opět byla směs promíchána a ponechána 5 minut stát. Poté bylo přidáno 1,5 ml NaOH a 1 ml destilované vody. Směs byla důkladně promíchána a ponechána 15 minut stát. Byla měřena absorbance při 510 nm. Jako kalibrační roztok byl použit katechin v koncentračním rozmezí 0,05-0,25 mg/ml.

4.7 Stanovení antioxidační aktivity

Roztok ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci $c = 7$ mmol/l. Reakci s 2,45 mmol/l peroxodisíranu draselného byl získán radikálový aniont ABTS^{•+}. Takto připravený roztok byl ponechán nejméně 12 hodin ve tmě. Před měřením byl roztok ABTS zředěn ethanolem na hodnotu absorbance přibližně $A=0,700$. Měření bylo prováděno při $\lambda=734$ nm oproti ethanolu.

K měření byla použita zúžená kyveta, do které byl napipetován 1 ml ABTS^{•+} a 10 μ l vzorku. Byl zaznamenán pokles absorbance po 10 minutách. Jako blank bylo použito 1 ml ABTS^{•+} a 10 μ l destilované vody. Kalibrační roztok troxolu byl připraven v koncentrační řadě 40 - 400 μ g/ml.

4.8 Stanovení antimikrobiální aktivity pomocí zákalu

Jako testovací modelové mikroorganismy byly zvoleny dva kmeny bakterií a jeden kvasinkový kmen (*Candida glabrata*). Z bakteriálních kmenů byl použit jeden grampozitivní – *Micrococcus luteus* a jeden gramnegativní kmen – *Serratia marcescens*. Kultury byly dlouhodobě uchovávány v podobě křížového roztěru na agarové plotně při 4 °C v lednici. Pro kultivaci bakterií bylo dle návodu na obalu připraveno vždy médium Nutrient Broth. Pro kultivaci bylo připraveno do 100 ml Erlenmayerovy baňky 50 ml média a sterilizováno v tlakovém hrnci. Po vychladnutí bylo médium zaočkováno ze zásobní kultury. Zaočkované médium bylo inkubováno 24 h v termostatu při 37°C za stálého třepání. Takto připravená inokula byla použita pro stanovení antimikrobiální aktivity na mikrotitrační destičce.

Do 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo vždy k 150 μ l buněčné kultury, připravené vhodným zředěním inokula připraveného dle předchozího postupu (ředění bylo provedeno příslušným sterilním médiem na koncentraci buněk přibližně $5E+8$ /ml), přidáno 50 μ l antimikrobiálního extraktu. Jako blank byla používána příslušná kultura s přidavkem 50 μ l

60 % ethanolu. Bylo použito 50 µl antibiotik Clotrimazol a Ampicilin o koncentraci 1mg/ml. Růst bakterií a absorbance při 630 nm byla měřena v čase 0 a po 24 h.

4.9 Diskový antimikrobiální test

Na Petriho misky bylo rovnoměrně rozmístěno 0,1ml 24hodinového inokula kultur *Candida glabrata*, *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*. Do média byly vytvořeny jamky pomocí špičky na pipety, do kterých bylo napipetováno 50µl tinktury. Dále byla napipetována antibiotika Clotrimazol na kvasinku, a Ampicilin na bakterie o koncentraci 1mg/ml. Jako blank byl použit 60 % líh, v kterém jsou připraveny tinktury. Po 24 hodinách byly změřeny inhibiční zóny.

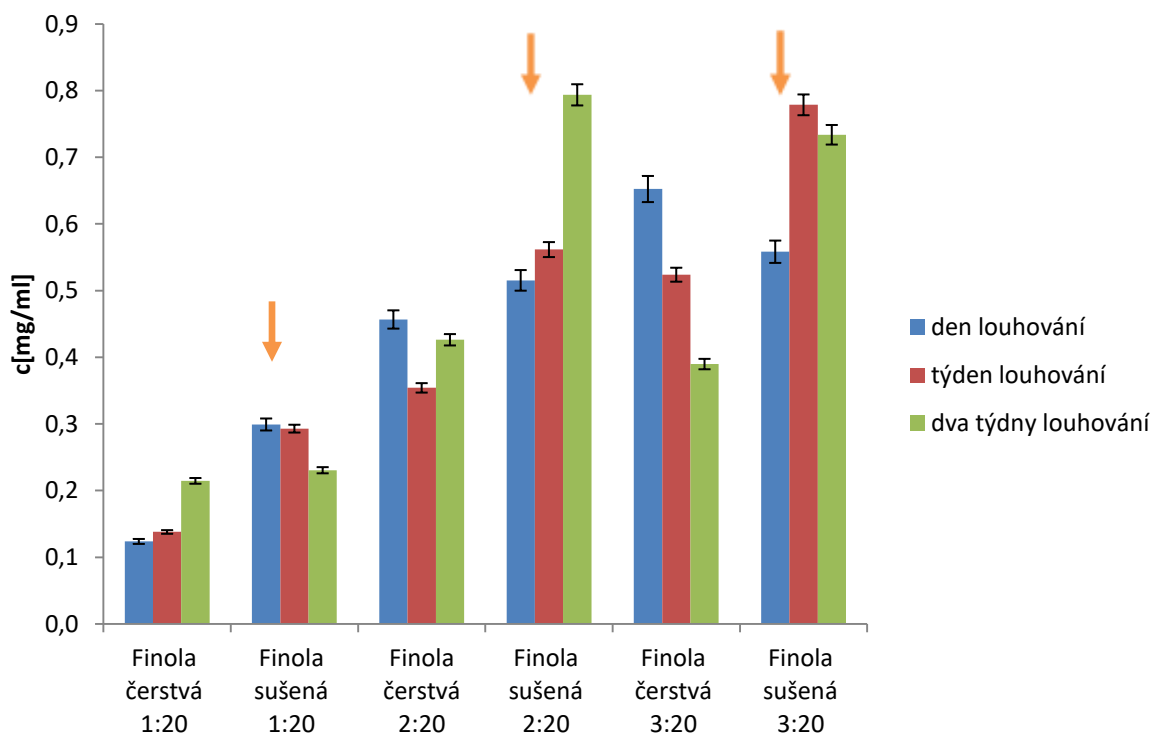
4.10 Tenkovrstvá chromatografie

Na TLC silikagel 60 RP-18 F_{254S} byla označena startovací čára přibližně 1,5 cm od okraje. Byla připravena mobilní fáze pro danou analýzu methanol: 5 % kyselině octové v poměru 19:1. Pracovní postup probíhal celou dobu v digestoři. Vzorky připravených tinktur a standardy kanabinoidů byly naneseny pomocí skleněných kapilár na startovací čáru, velikost nánosu vzorku byl méně než 5 mm. Takto připravená destička byla vložena do chromatografické komory, kde byla mobilní fáze, tak aby se hladina roztoku nedotýkala nanesených vzorků. Destička byla ponechána v komoře, dokud roztok nevystoupal 1,5 – 1 cm k hornímu okraji. Poté bylo vyvíjení zastaveno. Označil se konec vyvíjení a po oschnutí byla destička vložena do připraveného roztoku Fast Blue B Salt pro vizualizaci. Roztok FBB byl namíchan v koncentraci 50 mg/ 100ml vody.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Spektrofotometrické stanovení polyfenolů

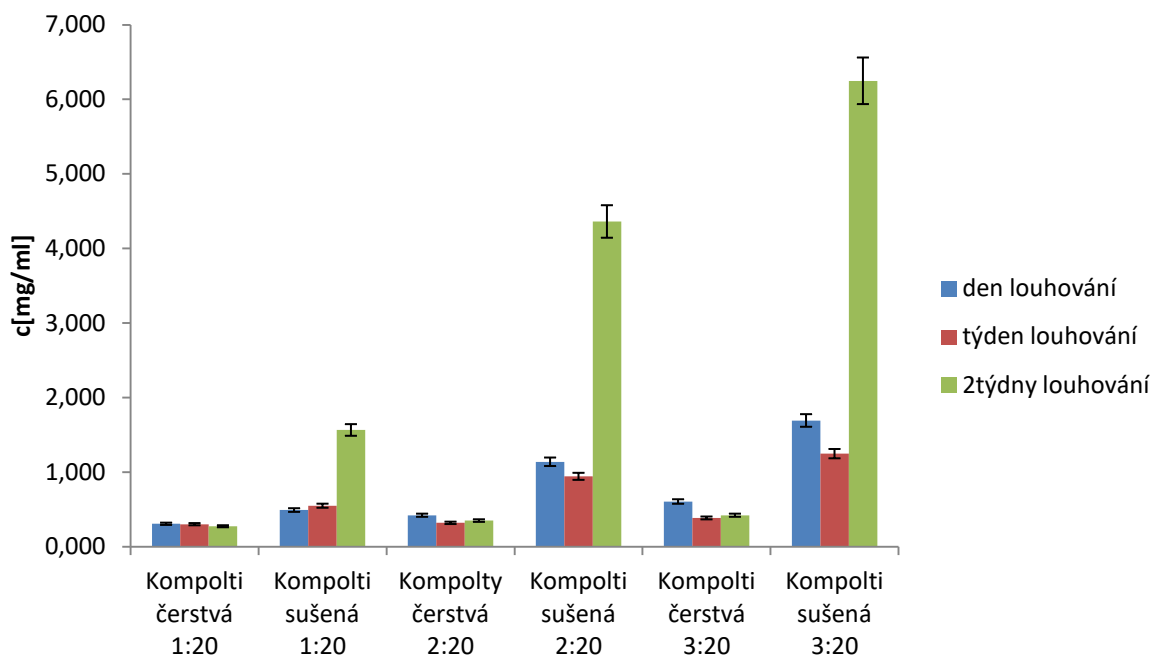
Stanovení polyfenolů bylo provedeno podle postupu 4.5. Celková koncentrace polyfenolů byla vypočtena z rovnice regrese kalibrační křivky: $y = 1,3356x$. Hodnoty byly vyneseny do grafu v závislosti obsahu polyfenolů na koncentraci připravených tinktur.



Obrázek 19: Obsah polyfenolů odrůda Finola – květ

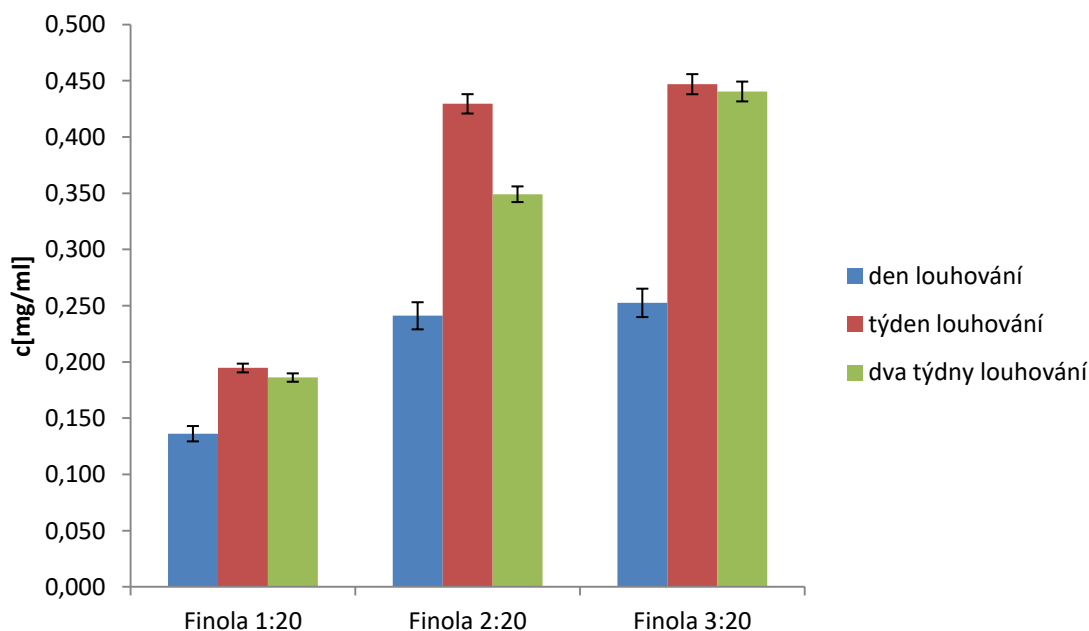
Grafické znázornění obsahu polyfenolů v květu odrůdy Finola můžeme vidět na Obrázek 19. Je zřetelné, že sušené květy mají více polyfenolů než květy čerstvé, což by mohlo být způsobeno procesem dekarboxylace, který probíhá při sušení. Sušené vzorky jsou označeny oranžovou šipkou.

Jak můžeme vidět na Příloha 1, Fedora obsahuje více polyfenolů než odrůda Finola na Obrázek 19. Každá odrůda má své charakteristické rysy a málokdy najdeme dvě odrůdy, které mají velmi podobné obsahy látek. U této odrůdy došlo u tinktur 2:20 a 3:20 ze sušeného květu k rapidnímu vzrůstu hodnot u dvou týdnů louhování. Pravděpodobně to může být způsobeno i tím, že tato rostlina může obsahovat více látek. Je to velice různorodá rostlina, která stále překvapuje tím, kolik látek obsahuje. Jak uvádí literatura, konopí obsahuje přes 500 látek, více jak 100 známých kanabinoidů a počet stanovených látek v konopí stále narůstá [8][10][50].



Obrázek 20: Obsah polyfenolů- Kompolti květ

Podle Obrázek 20, kde jsou výsledky tinktur odrůdy Kompolti, můžeme vidět, že u čerstvé rostliny nedocházelo k větším rozdílům obsahu polyfenolů při louhování. Dále si můžeme povšimnout, že tato odrůda obsahuje více polyfenolů než Finola a Fedora. Zatímco u sušených květů se opět hodnoty po dni a týdnu louhování téměř shodovaly (viditelné už u Fedory), tak po dvou týdnech louhování došlo k viditelnému vzrůstu obsahu polyfenolů.



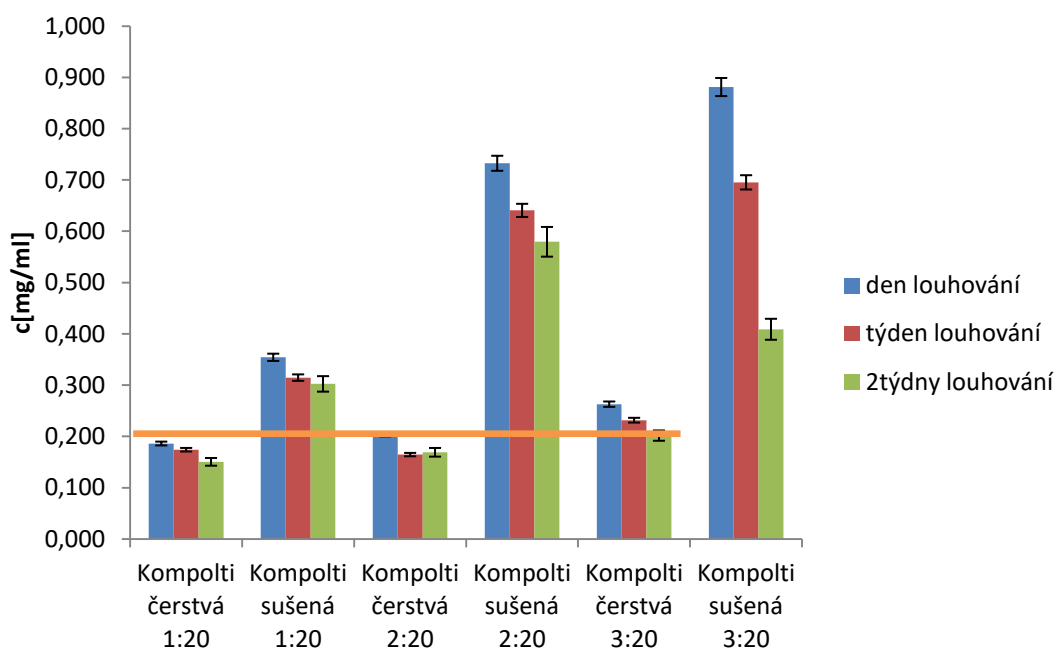
Obrázek 21: Obsah polyfenolů - Finola stonky

Na Obrázek 21 je znázorněn obsah polyfenolů ve stonku Finoly. Podle hodnot je patrné, že stonky obsahují méně polyfenolů než květy. Což se dalo i očekávat, protože nejvíce využívanou částí pro jakékoliv účely je právě květ a každá rostlina investuje živiny do tvorby květu. U vzorku 3:20 lze vidět, že hodnoty louhování týden a dva týdny se téměř neliší.

Poukazuje to pravděpodobně na menší obsah látek ve stonku. Podíváme-li se na ostatní odrůdy, tak u Kompolti je vidět postupný nárůst obsahu látek po čas louhování. Odrůda Fedora obsahuje více aktivních látek ve stonku než Finola po dvou týdnech louhování, ale jinak jsou hodnoty podobné. Grafické znázornění ostatních odrůd lze vidět v Příloha 2 a Příloha 3.

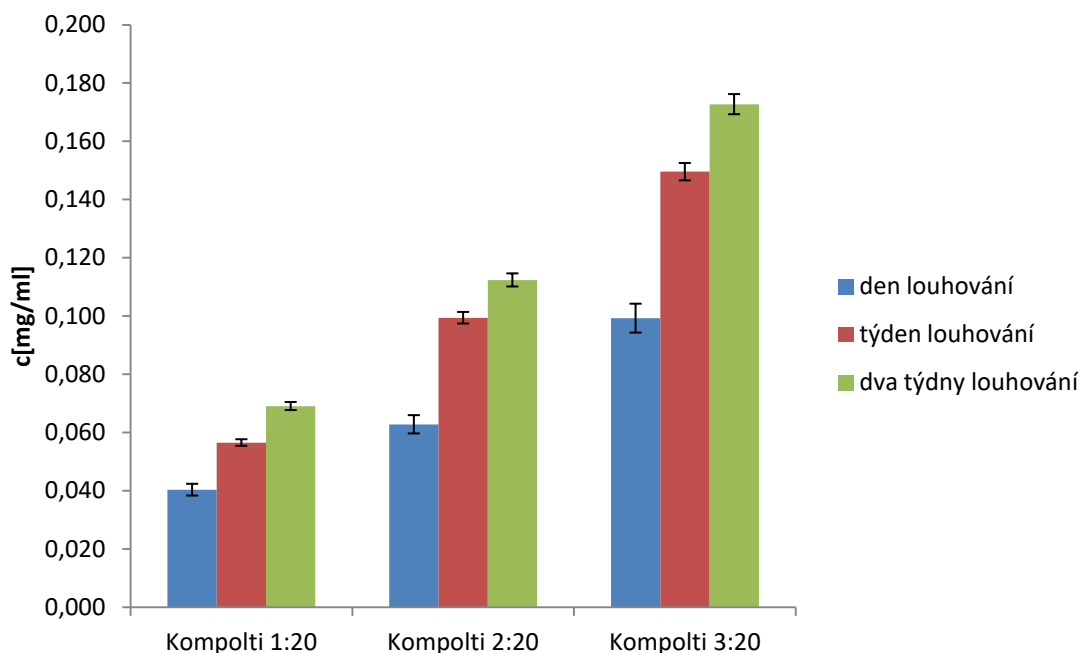
5.2 Spektrofotometrické stanovení flavonoidů

Spektrofotometrické stanovení flavonoidů bylo provedeno podle postupu 4.6. K výpočtu byla využita rovnice regrese z kalibrační přímky: $y = 2,2867x$. Vypočítané hodnoty byly vyneseny do grafů.



Obrázek 22: Obsah flavonoidů Kompolti květ

U květu z odrůdy Kompolti, jak je vidět na Obrázek 22, se hodnoty u čerstvých květů držely na podobných hodnotách (označené linkou) a hodnoty u sušených květů rostly. U sušených květů po dni louhování docházelo v průběhu dalších měření ke snižování obsahu flavonoidů. Pravděpodobně to mohlo být způsobeno jejich degradací (o flavonoidech je známo, že jsou chemicky nestálé, probíhá u nich neustálá transformace nebo metabolická degradace [51]). U zbylých dvou odrůd se hodnoty liší, pravděpodobně to bude způsobeno rozmanitostí konopí. Přesný obsah látek v konopí není doposud známý, neustále se analyzují nové sloučeniny, které jsou v této rostlině obsaženy. Identifikovaných látek (jak uvádí literatura [8][10][50]) je „pouze“ více než 100 sloučenin, ovšem víme, že konopí obsahuje nad 500 látek různého typu, z nichž velké zastoupení patří ke skupině terpenoidů. Grafické znázornění obsahu flavonoidů pro Finolu a Fedoru lze vidět v Příloha 4 a Příloha 6.

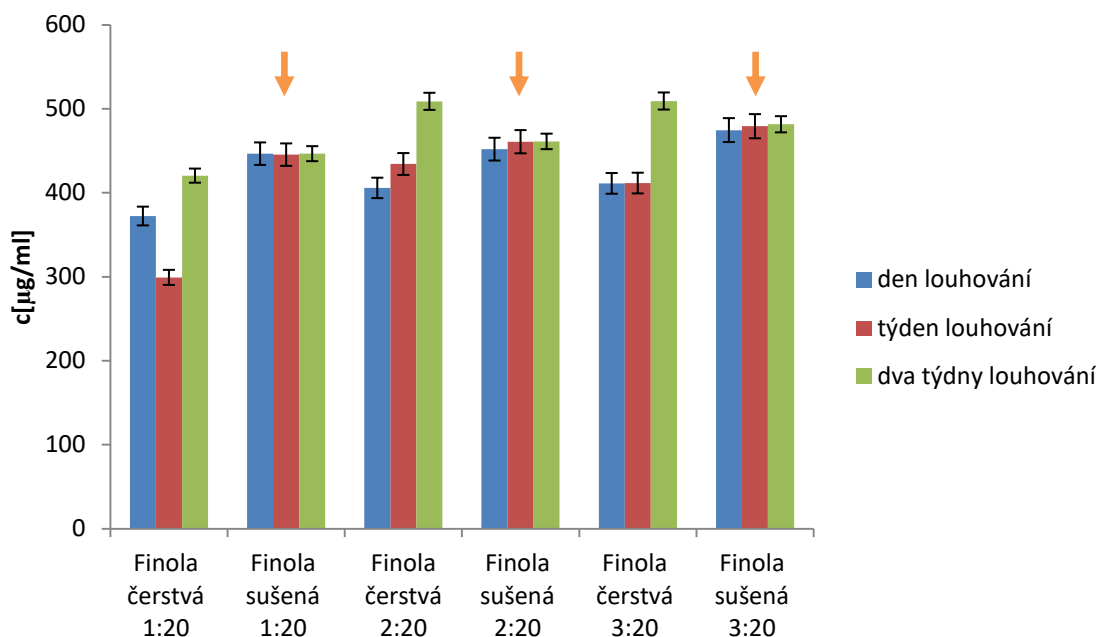


Obrázek 23: Obsah flavonoidů - Kompolti stonků

Obsah flavonoidů ve stonku Kompolti je vidět na Obrázek 23. Je zde vidět postupný nárůst flavonoidů po dobu louhování. Stonek obsahuje podstatně méně flavonoidů než květ, jako je tomu i u dalších odrůd. Možná z toho důvodu není tolik viditelná degradace flavonoidů ve stonku, jako je viditelná u květu. U odrůdy Finola (viz Příloha 5) můžeme vidět, že je minimální rozdíl v obsahu flavonoidů po týdně a dvou týdnech louhování. Mohlo by to tedy znamenat, že pro louhování by byla dostatečná doba týden a získali bychom stejný obsah látek v tinktuře jako po dvou týdnech louhování. Zatímco u Fedory (viz Příloha 7) po dvou týdnech louhování došlo k poklesu obsahu flavonoidů, což mohlo být způsobeno degradací některých flavonoidů. Vliv degradace je pravděpodobně u každé odrůdy jiný, protože každá odrůda je specifická pro obsah látek. Některá látka degraduje více či méně anebo může docházet k jiným změnám. Tyto procesy nejsou ještě dostatečně známy.

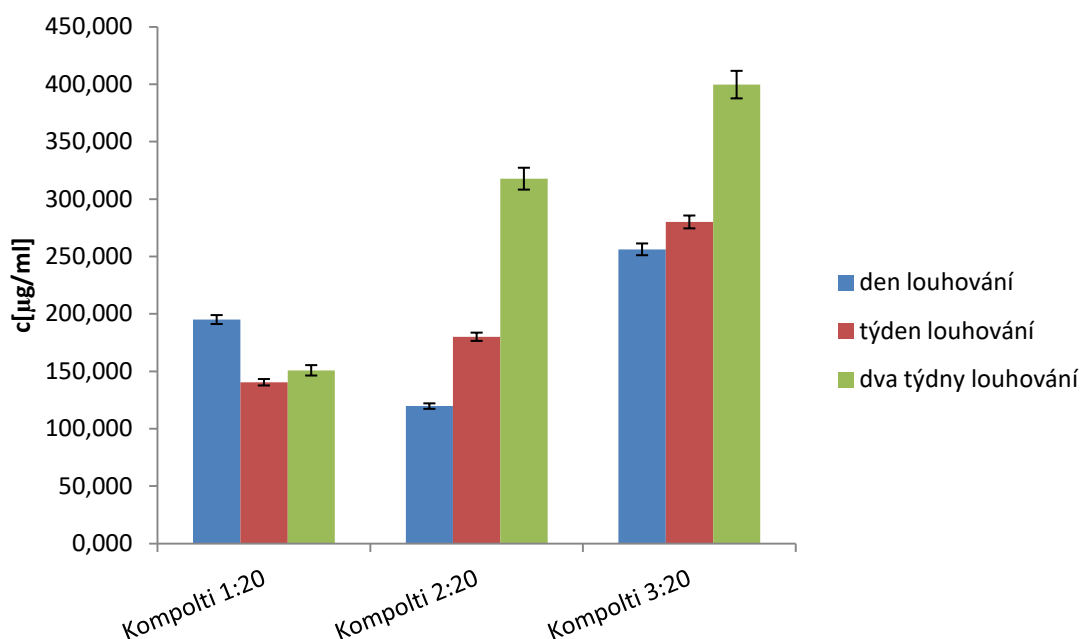
5.3 Stanovení antioxidační aktivity

Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno podle postupu 4.7. K výpočtu byla využita rovnice regrese z kalibrační přímky: $y = 0,0013x$. Vypočítané hodnoty byly vyneseny do grafů.



Obrázek 24: Antioxidační aktivita odrůda Finola – květ

Antioxidační aktivita květu Finoly je zobrazena na Obrázek 24. Oranžovou šipkou označené hodnoty jsou pro sušené květy. Je vidět, že antioxidační aktivita se u sušených květů téměř nemění v závislosti na době louhování. Pravděpodobně by to mohlo vysvětlovat vliv sušení, kdy dochází k dekarboxylaci kanabinoidů. Po usušení se jejich obsah nijak zvláště nemění, pokud je uskladněno správně (tmavý prostor, bez vlhka a při pokojové teplotě). U čerstvých květů je antioxidační aktivita největší po dvou týdnech louhování. K podobným výsledkům došlo u odrůdy Fedora. Navíc pokud porovnáme přibližnou číselnou hodnotu antioxidační aktivity těchto dvou odrůd, vidíme, že na grafu se pohybují kolem 450 µg/ml. Mohlo by to tedy znamenat, že jejich antioxidační aktivita v sušeném stavu je srovnatelná a stačí jeden den na louhování tinktury. U odrůdy Kompolti, jak je vidět v Příloha 9, se sušené květy liší od čerstvých v podstatě minimálně. Není tomu tedy tak, jak bylo u Finoly a Fedory (Obrázek 24 a Příloha 8), kde sušený květ měl vyšší antioxidační aktivitu než čerstvý. Můžeme zde pozorovat to, že hodnoty antioxidační aktivity jsou si velice podobné. Podobnost hodnot Finoly a Fedory můžeme pravděpodobně vysvětlovat tím, že tyto odrůdy si jsou celkem podobné (dobou zrání, využitím apod.) a odrůda Kompolti je z těchto odrůd nejvíce vlákněná odrůda a má nejdelší dobu zrání. Vyšší antioxidační hodnotu Kompolti může potvrdit i obsah polyfenolů (Obrázek 20), kde odrůda měla oproti Finole a Fedore mnohonásobně větší obsah.

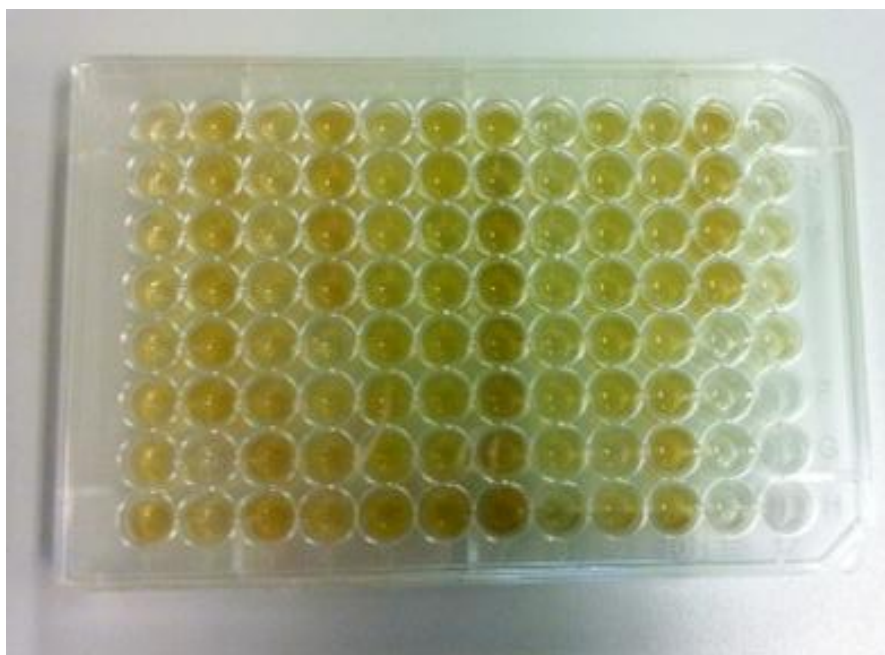


Obrázek 25: Antioxidační aktivita Kompolti stonků

Na Obrázek 25 je možné pozorovat antioxidační aktivitu stonku odrůdy Kompolti. U vzorku 2:20 a 3:20 je vidět postupný nárůst antioxidační aktivity v časovém úseku dvou týdnů. První vzorek 1:20 vykazoval největší aktivitu při jednom dni louhování a potom hodnota klesla. Pravděpodobně mohlo dojít k degradaci látek. Tato degradace mohla být viditelná pouze u vzorku 1:20, protože se jednalo o méně koncentrovaný vzorek než další zkoumané tinktury. A právě díky nízké koncentraci se mohla degradace projevit na výsledku, zatímco u více koncentrovaných tinktur nemusela být degradace tak moc viditelná. Finola (viz Příloha 10) vykazovala první den a druhý týden louhování skoro stejné hodnoty a největší antioxidační aktivitu vykazuje louhování po jednom týdnu. Odrůda Fedora (viz Příloha 11) vykazuje podobný trend jako Finola. Předpokládám, že zde došlo k degradaci, stejně jako u odrůdy Kompolti.

5.4 Stanovení antimikrobiální aktivity pomocí zákalu

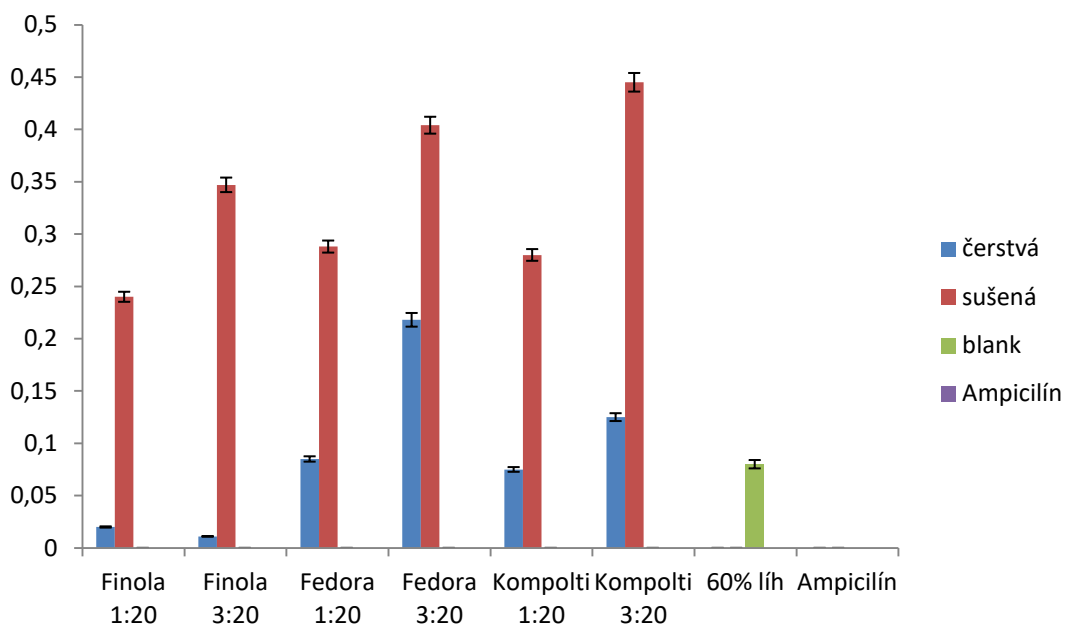
Podle postupu 4.8 bylo provedeno stanovení antimikrobiální aktivity pomocí zákalu. V čase 0 byl sledován rozpad buněk a v čase 24 hodin byla sledována inhibice růstu použitých mikroorganismů.



Obrázek 26: Mikrotitrační destička

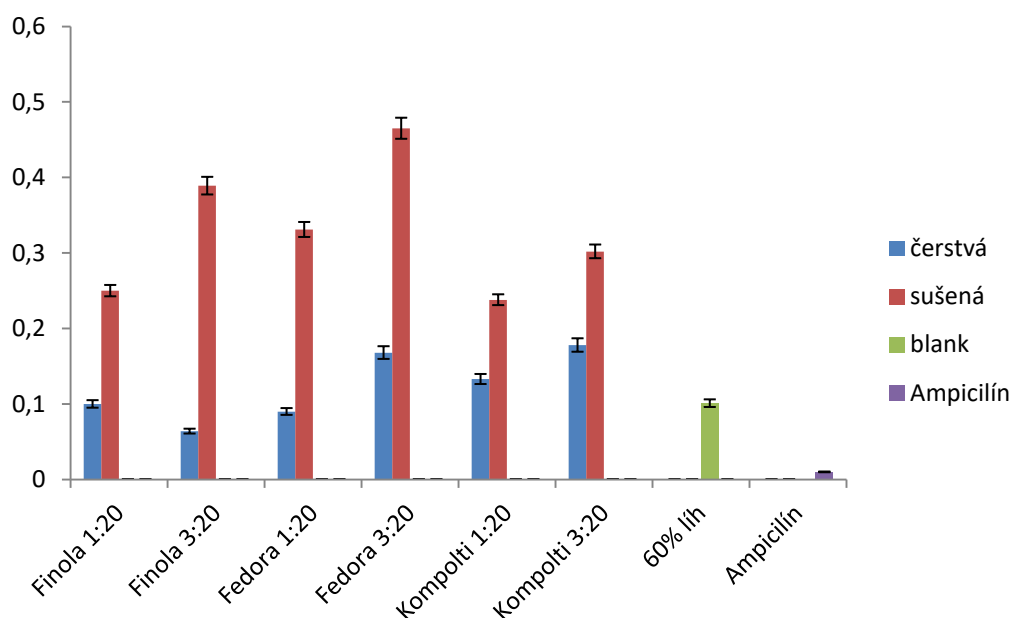
5.4.1 Rozpad buněk

Jak je vidět z grafů (Obrázek 27, Obrázek 28, Obrázek 29), tinktury ze sušených květů všech odrůd technického konopí vykazují okamžitý antibakteriální účinek jak na grampozitivní, gramnegativní bakterie, tak i na kvasinku. Jako blank byl použit 60 % ethanol, v kterém byly připraveny tinktury. Pokud jsou hodnoty vyšší než hodnoty samotného 60 % ethanolu, dochází k rozpadu buněk. Vyšší hodnoty byly prokázány pouze u sušeného květu, což dokazuje, že v průběhu sušení dochází k dekarboxylaci a vznikají aktivní formy kanabinoidů, proto čerstvá forma květu nemá takové účinky.



Obrázek 27: Antimikrobiální test *Micrococcus luteus*

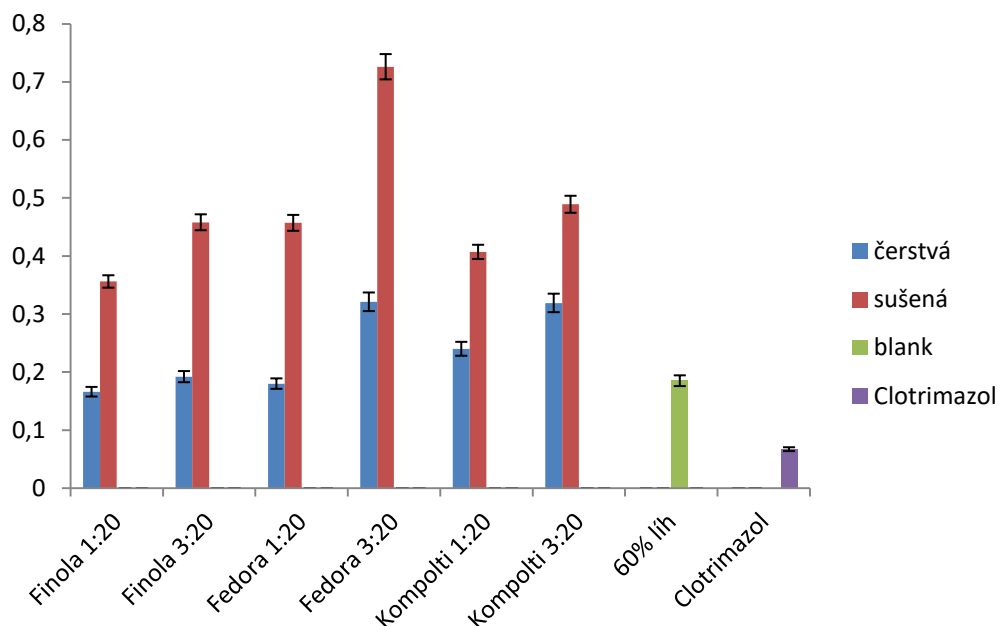
Výsledek působení tinktur z konopí na *Micrococcus luteus* je uveden na Obrázek 27. Jak je vidět, všechny použité tinktury ze sušeného květu měly větší vliv na rozpad buněk než z čerstvých květů. Nejvyšší vliv zde na Grampozitivní bakterii měla tinktura Kompolti 3:20, ale i Fedora, Finola měly dobré výsledky. Dále můžeme vidět, že antibiotikum Ampicilin o koncentraci 1 mg/ml nemělo žádný vliv na rozpad buněk. U antibiotik trvá delší dobu, než se projeví jejich účinek, proto se pravděpodobně žádný účinek neprojevil při měření v čase 0.



Obrázek 28: Antimikrobiální test *Serratia marcescens*

Na rozpad buněk u *Serratia marcescens* nejlépe fungovala tinktura ze sušeného květu Fedora 3:20, ale i u ostatních použitých tinktur ze sušeného konopného květu byl zaznamenán vliv na rozpad buněk, jak je vidět na Obrázek 28. Antibiotikum Ampicilín o koncentraci 1 mg/ml

nemělo opět vliv na rozpad buněk u gramnegativní bakterie (opět mohlo být způsobeno okamžitým měřením, antibiotikum potřebuje čas na proniknutí do buňky).

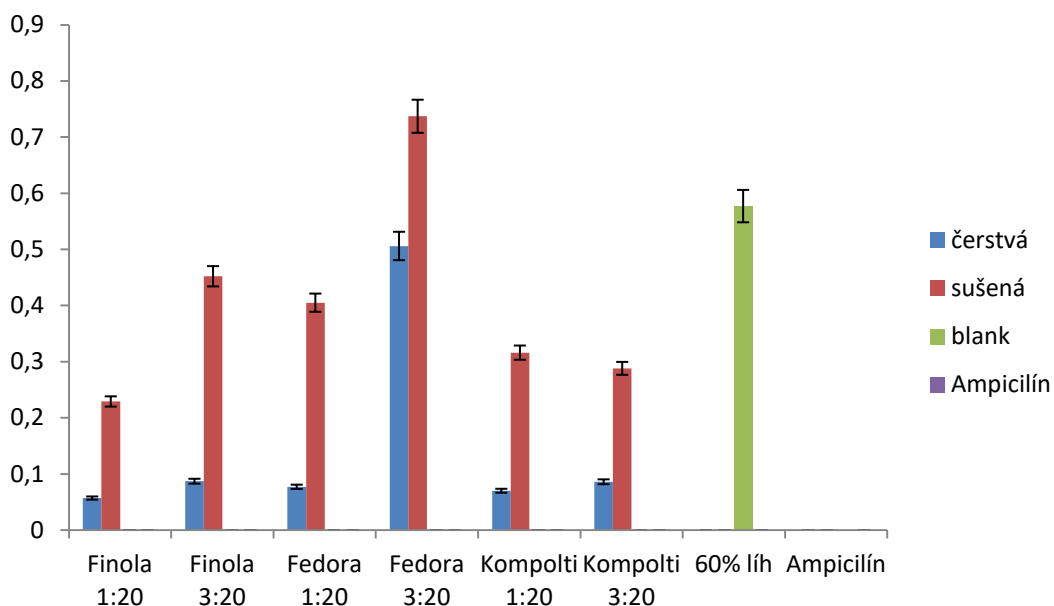


Obrázek 29: Antimikrobiální test *Candida glabrata*

U kvasinky *Candida glabrata* bylo použito antibiotikum Clotrimazol o koncentraci 1 mg/ml, který nevykazoval účinek na rozpad buněk (Obrázek 29). Neúčinek antibiotika mohl být způsoben stejným problémem jako u předchozích měření. Největší vliv na rozpad měla tinktura z konopí Fedora 3:20, ale i další tinktury ze sušeného květu vykazovaly účinnost.

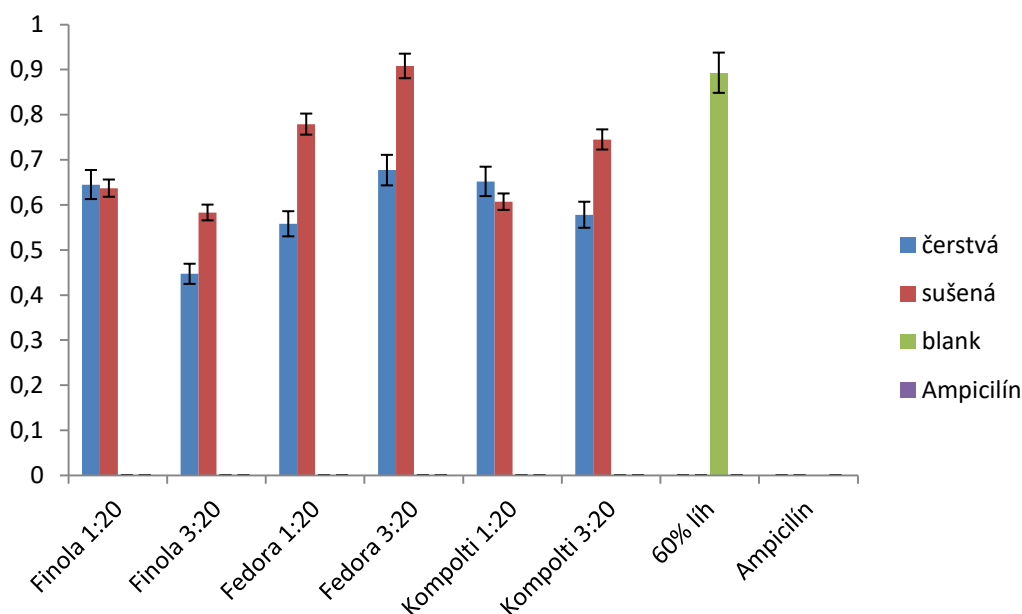
5.4.2 Inhibice růstu

Informace o výsledcích inhibice růstu můžeme vidět na Obrázek 30, Obrázek 31 a Obrázek 32. Blankem byl 60 % líh, pokud jsou hodnoty menší, než je hodnota blanku, znamená to, že je prokázána inhibice růstu daného mikroorganismu. Inhibice růstu byla prokázána na všech testovaných mikroorganismech, ať už působením tinktury z čerstvého nebo sušeného květu. Největší inhibici růstu ovšem vykazoval *Micrococcus luteus* za použití tinktur z čerstvého květu.



Obrázek 30: Inhibice růstu *Micrococcus luteus*

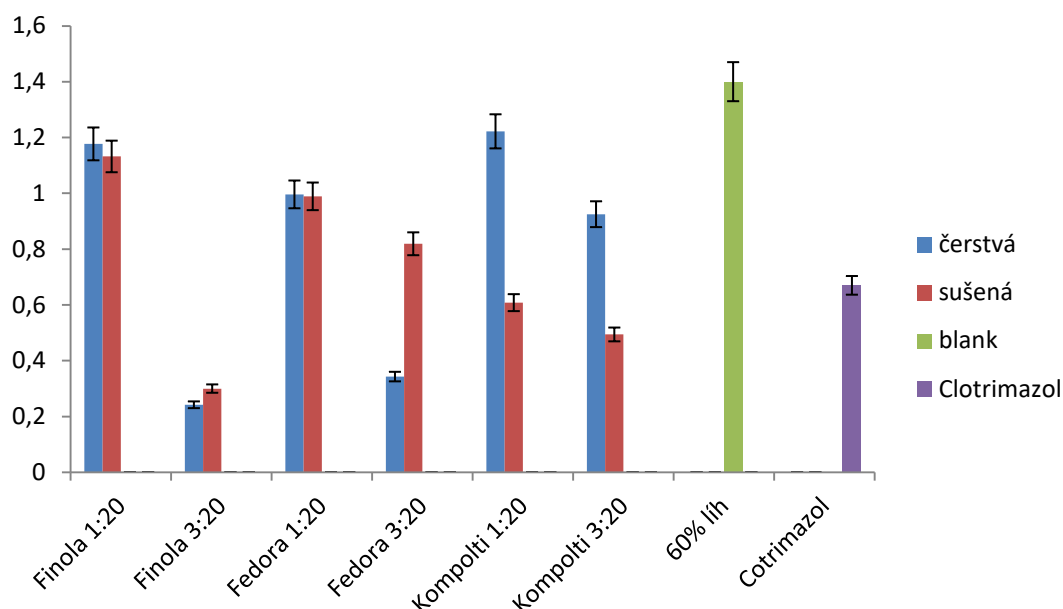
Byla prokázána inhibice růstu u *Micrococcus luteus*, která je znázorněna na Obrázek 30. Všechny hodnoty, které jsou menší než blank, prokazují inhibici růstu. Můžeme vidět, že na *Micrococcus luteus* nejlépe působily tinktury z čerstvých květů. Tinkтуры ze sušených květů vykazují také inhibiční aktivitu, ale viditelně menší než z čerstvých. Ampicilín (o koncentraci 1 mg/ml) působil nejlépe, ale některé tinktury se přiblížily podobnému účinku. Pravděpodobně by se dalo říci, že i *Cannabis sativa L.* může vykazovat antimikrobiální aktivitu.



Obrázek 31: Inhibice růstu *Serratia marcescens*

Na Obrázek 31 jsou výsledky inhibice růstu *Serratia marcescens*. U této bakterie můžeme vidět, že jsou velmi malé rozdíly v použití čerstvých nebo sušených květů. Ale tinktury opět

vykazují inhibici růstu bakterie, i když je inhibice menší než u *Micrococcus luteus*. Ampicilin (o koncentraci 1 mg/ml) funguje na tuto bakterii spolehlivě, byl prokázán jeho nejlepší účinek. Relativně malá účinnost konopných tinktur na *Serratia marcescens* by mohla být pravděpodobně způsobena uspořádáním buněčné stěny, kdy gramnegativní bakterie mají jinou strukturu buněčné stěny než grampozitivní, a proto může dojít k zhoršenému průchodu látek.












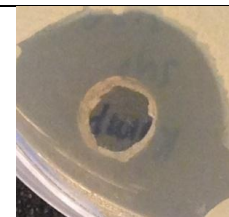
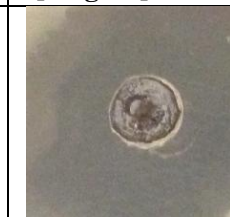
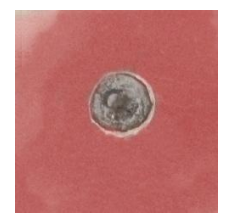
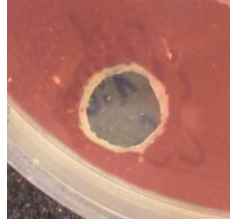
Obrázek 32: Inhibice růstu *Candida glabrata*

U kvasinky *Candida glabrata* můžeme vidět na Obrázek 32, že nejvíce inhibovala odrůda Finola v poměru 3:20 jak z čerstvého, tak ze sušeného květu. Samozřejmě, že i další tinktury vykazují inhibici růstu kvasinky, ale podstatně menší než Finola v poměru 3:20. Testované antibiotikum Clotrimazol (o koncentraci 1 mg/ml) vykazovalo také účinek na inhibici růstu, ale některé tinktury tento účinek vykazovaly lepší než dané antibiotikum.

5.5 Diskový antimikrobiální test

Byl proveden antimikrobiální diskový test za využití jamek v agaru. Do jamek bylo napipetováno 50 μ l vybraných tinktur. Jako blank byl použit 60 % lín a dále byla použita antibiotika Clotrimazol o koncentraci 1 mg/ml a Ampicilin o koncentraci 1 mg/ml. Byly zaznamenány inhibiční zóny, které jsou uvedeny v Tabulka 2.

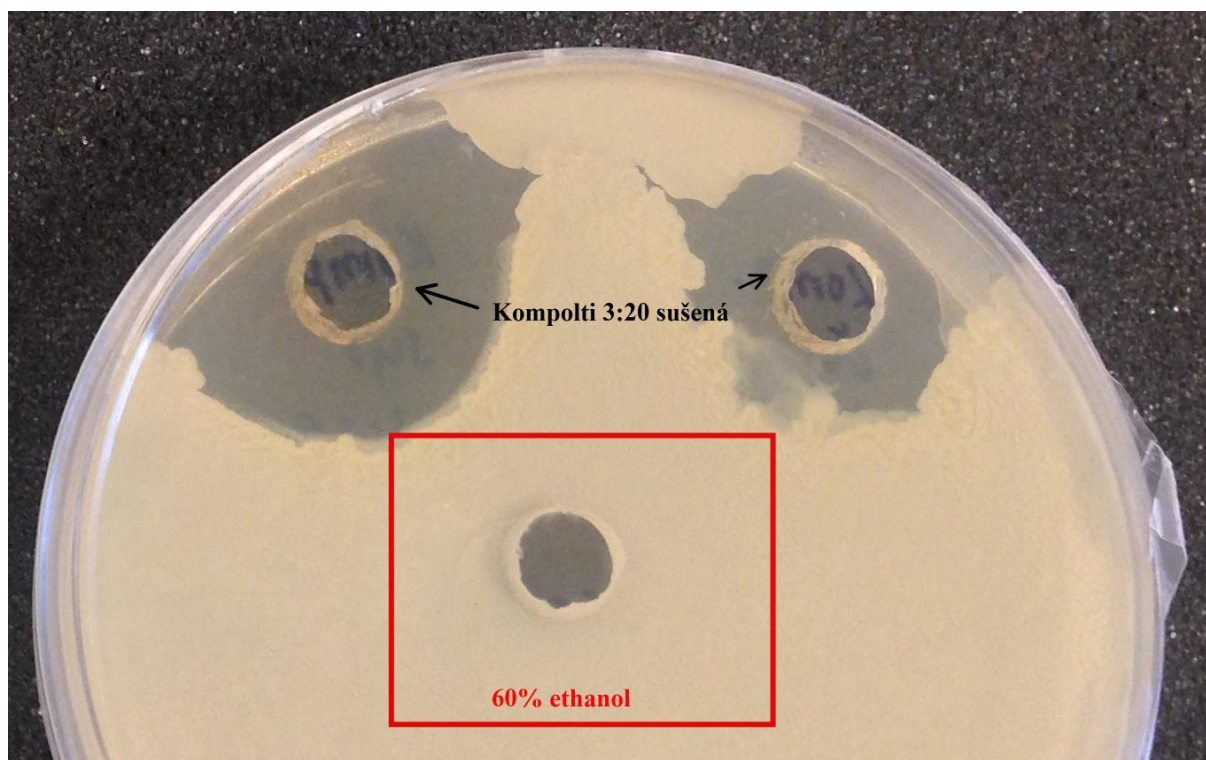
Tabulka 2: Diskový antimikrobiální test - inhibiční zóny

Vzorek čerstvý květ	Finola 3:20	Fedora 1:20	Clotrimazol c[1mg/ml]	
<i>Candida glabrata</i>				
Velikost zóny [mm]	1	12	15	
Vzorek čerstvý květ	Finola 3:20	Fedora 3:20	Kompolti 3:20	Finola 1:20
<i>Micrococcus luteus</i>				
Velikost zóny [mm]	5,6	6,5	6	6,5
Vzorek sušený květ	Finola 3:20	Fedora 3:20	Kompolti 3:20	Ampicilin c[1mg/ml]
<i>Micrococcus luteus</i>				
Velikost zóny [mm]	5,2	8	9,75	12
Vzorek čertsvý, sušený květ	Všechny použité tinkтуры	Ampicilin c[1mg/ml]		
<i>Sarratia marcescens</i>				
Velikost zóny [mm]	0	0		

U kvasinky *Candida glabrata* byl pozorován antimikrobiální účinek za použití tinktury z odrůdy Fedora. Inhibiční zóna byla 120 mm, což je blízká hodnota s antibiotikem Clotrimazol o koncentraci 1 mg/ml, který měl inhibiční zónu 150 mm.

U grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus* byl pozorován velice dobrý antimikrobiální účinek. Největší inhibiční zóna byla za použití tinktury ze sušeného květu u odrůdy Kompolti o velikosti 9,75 mm. Dobré výsledky byly i u tinktur z čerstvého květu u odrůdy Kompolti a Finola. Tyto výsledky potvrzují i výsledky z antimikrobiálního testu pomocí stanovení inhibičního účinku měřením zákalu při 630 nm, které jsou znázorněny na Obrázek 27. U bakterií bylo použito antibiotikum Ampicilín také v koncentraci 1 mg/ml. U Ampicilínu byla zaznamenána inhibiční zóna 12 mm. Podobnou hodnotu inhibiční zóny měla tinktura ze sušeného květu Kompolti v poměru 3:20, kde byla naměřena inhibiční zóna 9,75 mm.

U gramnegativní bakterie *Serratia marcescens* nebyl pozorován žádný antimikrobiální účinek ani při použití Ampicilínu v koncentraci 1 mg/ml. Při antimikrobiálním testu pomocí stanovení inhibičního účinku měřením zákalu při 630 nm byla viditelná malá inhibice za použití některých tinktur, ale právě tato inhibice mohla být tak malá, že se na diskovém antimikrobiálním testu neukázala. U antibiotika Ampicilín byl na stanovení inhibičního účinku měřením zákalu při 630 nm potvrzen účinek inhibice růstu po 24 hodinách. To, že tinktury z konopí vykazují aktivitu u grampozitivních bakterií a ne u gramnegativních, může být způsobeno strukturou těchto bakterií. Gramnegativní mají vnější lipopolisacharidovou membránu, zatímco grampozitivní bakterie tuto vnější membránu postrádají. Proto je možné, že se tinktura lépe dostala dovnitř a mohla působit.

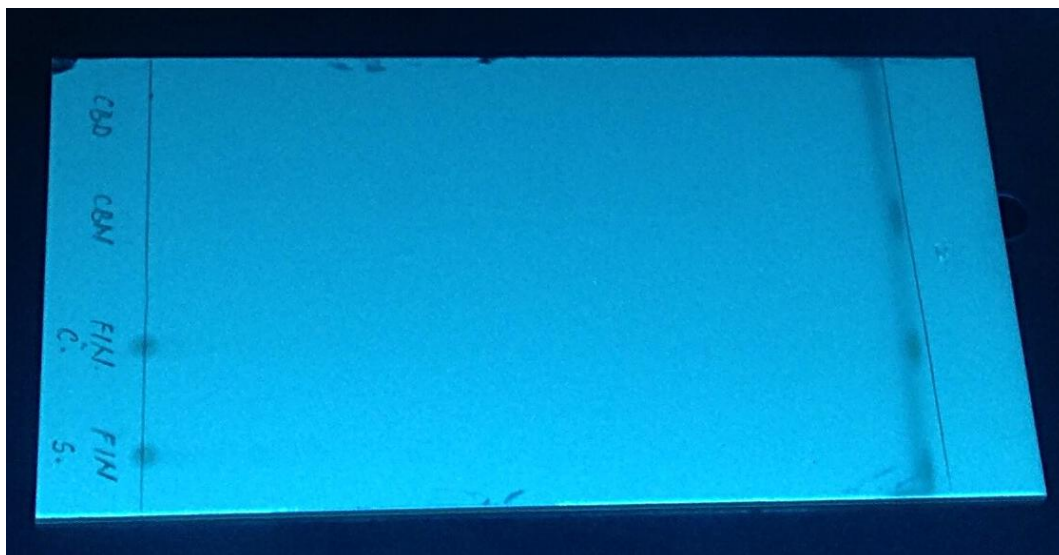


Obrázek 33: Antimikrobiální diskový test - ML - 60% etanol

Účinnost 60 % ethanolu, v kterém byly připraveny tinktury, můžeme vidět na Obrázek 33. Obrázek ukazuje porovnání použití tinktury z odrůdy Kompolti 3:20 sušený květ. Je patrné, že samotný 60 % ethanol nevykazoval antimikrobiální účinek. Mohlo to být způsobeno odpařením ethanolu, čímž došlo ke snížení koncentrace. Zatímco u tinktury z Kompolti je jasně zóna vidět.

5.6 Tenkovrstvá chromatografie

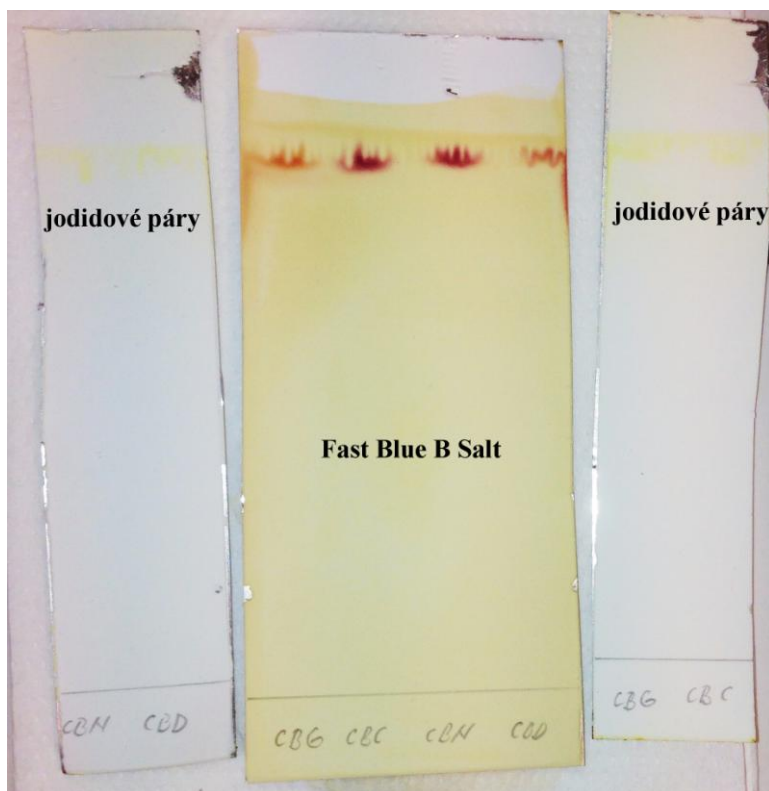
Byla provedena analýza konopí pomocí tenkovrstvé chromatografie dle 4.10. Samotná analýza TLC nepodá žádné výsledky ohledně kvantity, ale alespoň lze vizuálně zjistit, zda jsou dané kanabinoidy přítomny. Pro určení jednotlivých kanabinoidů byly použity standardy od firmy Sigma-Aldrich. Analyzovány byly připravené tinktury po třech týdnech louhování v koncentracích 1:20 a 3:20. Tinktury byly jak ze sušených, tak čerstvých květů. Tato analýza byla ze začátku optimalizována, než se dostalo uspokojivých výsledků. Byly využity různé mobilní fáze dle [50] v různých koncentracích.



Obrázek 34: Analýza pomocí chloroform: methanol, vizualizace UV světlem

Byla použita mobilní fáze chloroform: methanol v poměru 19:1, kde bylo využito vizualizace pomocí záření o vlnové délce 254 nm (výsledek lze vidět na Obrázek 34). Vzorky byly nanесeny na destičku TLC silikagel 60 RP-18 F_{254S}. Můžeme pozorovat, že nedošlo k oddělení fází a většina vzorku byla unášena vzhůru.

Jako další možnost byla vyzkoušena silufolová destička, která je běžně využívána k tenkovrstvé chromatografii. Pro tuto analýzu byla využita stejná mobilní fáze (chloroform: methanol v poměru 19:1). V rámci tohoto testu byla využita vizualizace pomocí jodidových par a barviva Fast Blue B Salt.

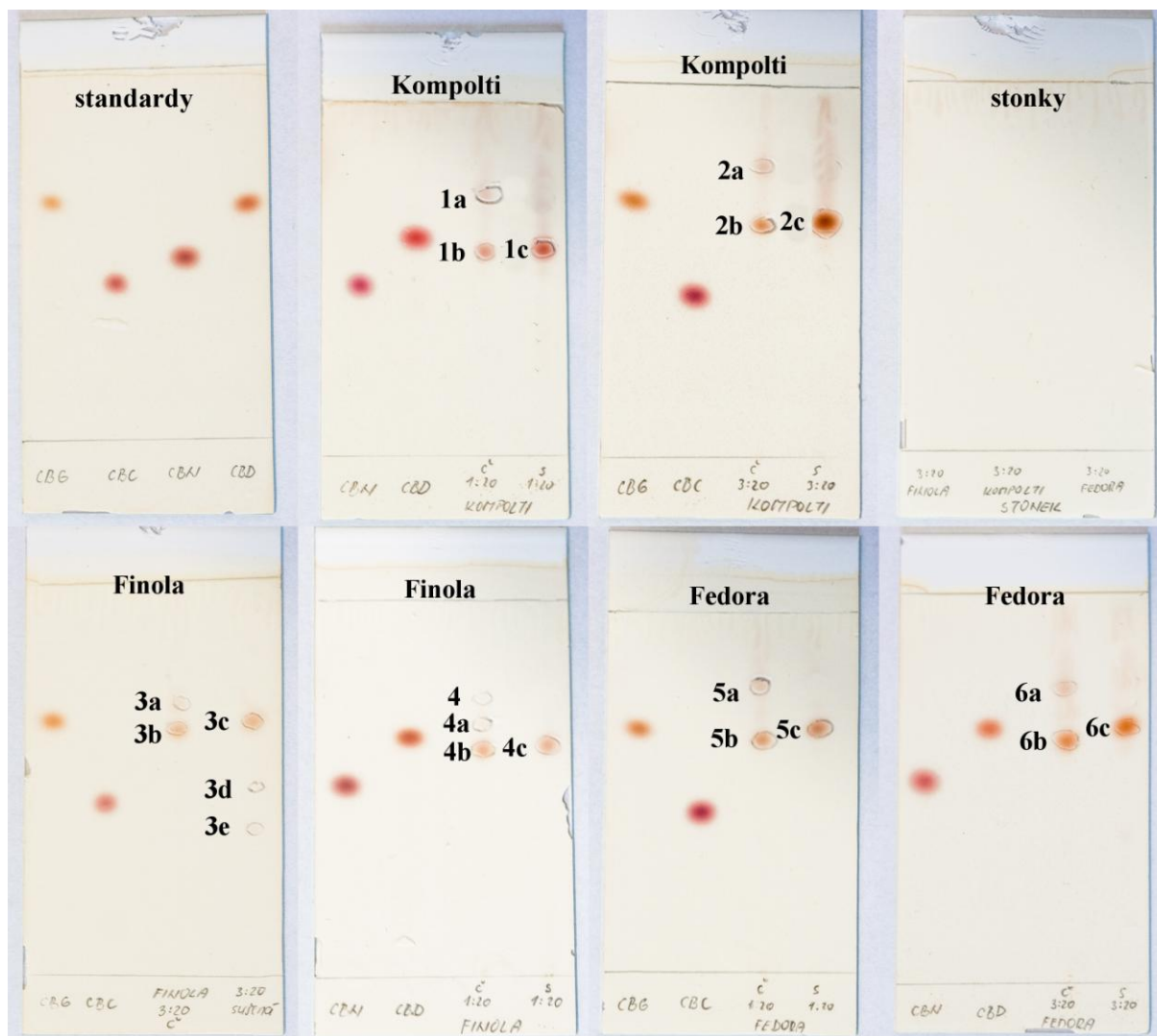


Obrázek 35: Využití vizualizace pomocí jodidových par a Fast Blue B Salt

Výsledky dané analýzy lze vidět na Obrázek 35. Opět je vidět, že analýza byla neúspěšná, nedošlo k rozdělení a vzorek byl unášen mobilní fází vzhůru. Vizualizace pomocí jodidových par neukázala zdaleka takové rozlišení jako vizualizace pomocí Fast Blue B Salt. Při použití FBB došlo k barevnému rozlišení jednotlivých kanabinoidů, které bylo shodné s publikací [50], zatímco u jodidových par k takovému odlišení nedošlo.

Jako další mobilní fáze byla využita kombinace methanol: 5 % kyselina octová: chloroform v poměrech 19 : 1 : 1, využita byla silufolová destička. I tato analýza dosáhla podobných výsledků jako předchozí, takže nedošlo k rozdělení fází.

Jediný pozitivní výsledek byl prokázán za využití TLC silikagel 60 RP-18 F_{254S} a mobilní fáze methanol: 5 % kyselině octové v poměru 19:1.



Obrázek 36: Výsledky TLC analýzy

Výsledek z této analýzy můžete vidět na Obrázek 36. Jak lze vidět, došlo k rozdělení jednotlivých kanabinoidů. Vyhodnocení jednotlivých kanabinoidů bylo zaznamenáno do Tabulka 3. Stanovené retenční faktory i barevné rozlišení kanabinoidů byly shodné s publikací doktora Hazempa [50].

Tabulka 3: Vyhodnocení TLC

Odrůda	Označení	Rf	Kanabinoid	Barva FBB
Kompolti čerstvá 1:20	1a	0,67	CBDA	hnědo oranžová
	1b	0,58	CBD	oranžová
Kompolti sušená 1:20	1c	0,585	CBD	oranžová
Kompolti čerstvá 3:20	2a	0,67	CBDA	hnědo oranžová
	2b	0,585	CBD	oranžová
Kompolti sušená 3:20	2c	0,6	CBG	oranžová
Finola čerstvá 3:20	3a	0,68	CBDA	světle červená
	3b	0,59	CBD	oranžová
Finola sušená 3:20	3c	0,6	CBD	oranžová
	3d	0,48	CBN	tmavě fialová
	3e	0,37	CBC	fialová
Finola čerstvá 1:20	4	0,7	CBDA	světle červená
	4a	0,66	CBGA	hnědo oranžová
	4b	0,59	CBG	oranžová
Finola sušená 1:20	4c	0,59	CBG	oranžová
Fedora čerstvá 1:20	5a	0,68	CBDA	hnědo oranžová
	5b	0,59	CBD	oranžovo červená
Fedora sušená 1:20	5c	0,58	CBD	oranžovo červená
Fedora čerstvá 3:20	6a	0,68	CBDA	hnědo oranžová
	6b	0,585	CBD	oranžová
Fedora sušená 3:20	6c	0,59	CBG	oranžová

V Tabulka 3 jsou znázorněny kanabinoidy, které byly viditelné při TLC analýze. Na Obrázek 36 je viditelné, že odrůda Kompolti má mnohem výraznější, sytější barvy než odrůdy Finola a Fedora. Lze konstatovat, že obsahuje větší zastoupení daných kanabinoidů oproti odrůdám, které byly testovány. Nejméně syté barvy měla odrůda Finola, která by pravděpodobně měla obsahovat menší zastoupení kanabinoidů. Analýza byla provedena zvláště pro standardy kanabinoidů: CBC, CBN, CBG, CBD. Jiné standardy nebyly k dispozici. To, že „nejhůře“ dopadla odrůda Finola, nemusí znamenat, že obsahuje málo léčivých látek. Bylo provedeno testování pouze na čtyři kanabinoidy, ale jak víme, kanabinoidů je mnohem více [8][10][50].

Finola prokázala u antimikrobiálních testů dobré výsledky u *Micrococcus luteus*, kdy byla naměřena inhibiční zóna u sušeného vzorku 5,2 mm, což lze potvrdit i přítomností kanabinoidů CBC, CBN, CBD, jak prokázala analýza TLC. V čerstvém vzorku byla analyzována i kyselina kanabidiolová. Kyseliny kanabinoidů se vyskytují pouze v čerstvých rostlinách, proto se CBDA a CBGA už nevyskytly v rámci TLC analýzy v sušeném vzorku. Při sušení dochází k dekarboxylaci, kdy se kyselé formy kanabinoidů mění na kanabinoidy.

Fedora měla více syté barvy kanabinoidů než Finola. Pokud se podíváme na výsledky z antimikrobiálních testů, vedla si tato odrůda velice dobře (viz Tabulka 2). U *Candida glabrata* dosáhla téměř stejné inhibiční zóny jako antibiotiku Clotrimazol a u *Micrococcus luteus* měla také velice dobré výsledky. Byly analyzovány kanabinoidy CBD, CBG, které mají vysoké protizánětlivé a fungicidní účinky.

Kompolti dopadla z testovaných odrůd nejlépe. Z TLC analýzy vyplývá, že obsahuje teoreticky nejvíce kanabigerolu, protože měla nejsytější barvy kanabinoidů po vizualizaci.

Výborné výsledky byly naměřeny i při antimikrobiálních testech, kdy u *Micrococcus luteus* byla naměřena inhibiční zóna 9,75 mm, což je hodnota blízká inhibiční zóně antibiotika Ampicilin. I tento výsledek by mohl potvrzovat obsah CBG i CBD, který byl prokázán v TLC analýze.

Rozlišení kanabinoidů CBD a CBG je velice složité. Mají blízké retenční faktory a někdy i vizuální rozlišení v rámci TLC analýzy pomocí FBB, proto je problém tyto dva kanabioidy správně identifikovat. Abychom si byli jisti, že se jedná o daný kanabinoid, bylo by potřeba využít citlivější analytické metody.

Ve stoncích odrůd nebyly nalezeny touto metodou žádné kanabinoidy. Jak je známo, kanabinoidy jsou přítomny v květech rostlin a ve stonku mohou být přítomny ve stopovém množství. Takto malé množství nelze vizualizovat pomocí tenkovrstvé chromatografie, bylo by zapotřebí využít citlivějších metod.

Pokud by se díky rozsáhlejší testům podařilo prokázat, že technické konopí má účinky jako konopí pro léčebné účely, bylo by to pro pacienty ekonomicky výhodnější a samotná legislativa by mohla být jednodušší. Díky tomu, že konopí vykazuje antimikrobiální účinek, daly by se extrakty využít do vaginálních čípků k lokální léčbě či do mastí k léčbě mykotických onemocnění. Tinkтуры by mohly být použity pro léčbu bércových vředů, kde by měly funkci vyčistit ránu a zároveň by díky kanabinoidům působily protizánětlivě a antimikrobiálně. Využití konopí v léčbě je velická škála, jak už bylo popsáno, konopí pro lékařské účely pomáhá v léčbě epilepsie, chronické bolesti a dalších závažných onemocnění. Není vyloučeno, že by se i technické konopí dalo zpracovat podobným způsobem.

6 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na využití konopí setého. K dispozici byly tři odrůdy: Finola, Fedora, Kompolti. U těchto odrůd byla provedena charakterizace. Z dostupných odrůd byly připraveny tinktury z čerstvé a sušené rostliny. Provedlo se stanovení obsahu polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity. U připravených tinktur byl testován antimikrobiální účinek za využití mikroorganismů. Účinek byl porovnán s běžně používanými antibiotiky. Byli vybráni zástupci z řad Grampozitivních, Gramnegativních bakterií a kvasinek. Dále bylo provedeno stanovení obsahu čtyř kanabinoidů (CBC,CBN, CBD, CBG) v tinkturách pomocí tenkovrstvé chromatografie. Výsledky byly porovnány se standardy testovaných kanabinoidů.

Z analýzy stanovení polyfenolů a flavonoidů je zřejmé, že obsah těchto látek byl vyšší v sušených květech než v čerstvých. Je to způsobeno dekarboxylací, kdy v čerstvé rostlině jsou přítomny kyseliny kanabinoidů, které se při sušení mění na kanabinoidy. Kyselé formy kanabinoidů nemají takové účinky jako samotné kanabinoidy. Nejvíce polyfenolů a flavonoidů měla odrůda Fedora. Při stanovení antioxidační aktivity bylo zjištěno, že u všech tří odrůd jsou podobné hodnoty antioxidační aktivity u sušené rostliny. U odrůdy Finola je vidět, že se minimálně liší rozdíl v tinktuře v poměru 1:20, 2:20 a 3:20, hodnoty jsou téměř totožné. Podobný trend je i u Fedory. U Kompolti je i méně patrný rozdíl v antioxidační aktivitě mezi čerstvým a sušeným květem. Tinkтуры ze stonků rostlin vykazovaly menší obsah polyfenolů, flavonoidů i antioxidační aktivity oproti květům, což se dalo očekávat, protože kanabinoidy jsou obsaženy nejvíce v květech rostlin.

Testování antimikrobiální aktivity připravených tinktur mělo pozitivní výsledek. Pozitivní vliv na rozpad buněk vybraných mikroorganismů, který se stanovoval pomocí stanovení inhibičního účinku měřením zákalu při 630 nm, měly všechny tinktury. Byly testovány mikroorganismy *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Candida glabrata*. U všech byl prokázán vliv na rozpad buněk u tinktur ze sušených rostlin. Většina použitých tinktur měla větší účinek než použité antibiotikum. U testování inhibice růstu byly prokázány pozitivní výsledky jak u tinktur ze sušeného, tak z čerstvého konopí. Antibiotika měla lepší účinek na inhibici růstu než připravené tinktury. V rámci antimikrobiálních testů byl proveden i diskový test, který prokázal překvapivé výsledky. Při testování kvasinky *Candida glabrata* měla pozitivní účinek tinktura z čerstvého květu Fedory v poměru 1:20. Inhibiční zóna této tinktury byla změřena na 12 mm. Tato hodnota inhibiční zóny je velice blízká inhibiční zóně používaného antibiotika Clotrimazol, které má inhibiční zónu 15 mm. Ugrampozitivní bakterie *Micrococcus luteus* byly zjištěny inhibiční zóny u tinktur z čerstvých květů, které se pohybovaly v rozmezí 5,5 – 6,5 mm. Tinkтуры ze sušeného květu měly vyšší inhibiční zóny. Velmi dobrý výsledek byl prokázán u Fedory 3:20, kde byla naměřena inhibiční zóna 8 mm, u Finoly 3:20 velikost zóny 5,2 mm. Největší inhibiční zónu měla tinktura z odrůdy Kompolti 3:20, kde byla naměřena velikost 9,75 mm. Tato hodnota je blízká hodnotě inhibiční zóny antibiotika Ampicilin, který měl zónu o velikosti 12 mm. Na gramnegativní bakterii *Serratia marcescens* nebyl pozorován žádný účinek, ani účinek antibiotika Ampicilin. Jedná se o rezistentní druh gramnegativní bakterie. Neúčinnost antibiotik a tinktur by se mohla vysvětlit i odlišnou strukturou buněčné stěny oproti grampozitivním bakteriím. Gramnegativní mají vnější lipopolysacharidovou membránu, zatímco grampozitivní bakterie tuto vnější membránu postrádají, proto je možné, že se tinktura lépe dostala dovnitř a mohla působit. Minimální účinek byl pozorován u stanovení inhibičního účinku měřením zákalu při 630 nm, ale inhibice mohla být tak malá, že se neprojevila na diskovém testu. Skutečnost, že

konopí vykazuje antimikrobiální účinek, mají na starosti právě kanabinoidy, které byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie. Byly testovány čtyři vybrané kanabinoidy, a to CBN, CBD, CBG, CBC. Výsledky byly porovnány se standardy kanabinoidů, díky kterým mohly být určeny kanabinoidy v připravených tinkturách. Z výsledků je na první pohled jasné, že nejvíce kanabinoidů obsahuje odrůda Kompolti. Měla nejvíce syté barvy oproti Finole. Tento výsledek by mohl potvrzovat i to, že Kompolti měla velmi dobrý výsledek u antimikrobiálních testů pomocí stanovení inhibičního účinku měřením zákalu při 630 nm i na diskovém testu. Bylo zjištěno, že Kompolti obsahuje CBG i CBD, které mají protizánětlivý účinek. Jako druhá odrůda, která by měla obsahovat více kanabinoidů, je Fedora. Fedora prokázala také dobré antimikrobiální účinky. U této odrůdy byl stanoven obsah CBD, který má protizánětlivý a fungicidní účinek, právě proto byla nejvíce účinná na kvasinku, zatímco ostatní testované odrůdy účinek nevykazovaly. Odrůda Finola podle sytosti barev při tenkovrstvé analýze obsahuje nejméně kanabinoidů. Stanoveny u ní byly CBG, CBN, CBC. U tinktur z čerstvých květů byly stanoveny i některé kyseliny kanabinoidů jako například CBGA a CBDA. Tato kyselina není dále přítomna u tinktur ze sušených květů, což dokazuje jev dekarboxylace.

Dalo by se tedy předpokládat využití konopí *Cannabis sativa L.* jako potenciálního léčiva, které by mohlo pomoci s problémem rezistence antibiotik či řešit vážná onemocnění. Pro potvrzení, zda by se místo konopí pro léčebné účely dalo využít konopí technické, by bylo potřeba dalších a citlivějších analytických metod. Testování ztěžuje česká legislativa kvůli psychoaktivnímu účinku konopí a jeho zneužívání jako drogy.

7 LITERATURA

- [1] MIOVSKÝ, Michal. Konopí a konopné drogy: adiktologické kompendium. Vyd. 1. Praha : Grada publishing, 2008. 548 s. ISBN 978-80-247-0865-2
- [2] RUMAN, Michal. Konopí: biomasa pro život. Chvaleč : Konopa, 2007. 26 s. ISBN 978-80-254-1149-0
- [3] RUMAN, Michal. Konopí: staronový přítel člověka. Chvaleč : Konopa, 2008. 31 s. ISBN 978-80-254-1825-3
- [4] Biotechnology and Medical Marijuana. Montana BioTech [online]. [cit. 2016-03- 22]. Dostupné z: <http://montanabiotech.com/2011/03/16/biotechnology-and-medicalmarijuana/>
- [5] Indica vs. sativa. *Legalizace*. 2014, **2014**(5), 62-63. ISSN 1804-9818.
- [6] BJELKOVÁ, M.: Vybrané vlastnosti odrůd konopí setého, Agritec Plant Research s. r. o., [online], [cit. 2016 - 17 - 7]. Dostupné na: http://trawa.cz/wp-content/uploads/2015/04/23-konopi_sete.pdf
- [7] TOŠOVSKÁ , Marie, et al. Situační a výhledová zpráva Len a konopí červen 2007. Praha : Mze ČR, 2007. Pěstování konopí setého, s. 35-39
- [8] IZZO, Angelo A., et al. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in pharmacological sciences*, 2009, 30.10: 515-527.
- [9] RUSSO, Ethan B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British journal of pharmacology*, 2011, 163.7: 1344-1364.
- [10] ELSOHLY, Mahmoud A. Marijuana and the cannabinoids [online]. Totowa, N.J.: Humana Press, c2007, 322 s. [cit. 2016-03-22]. ISBN 9781592599479-. Dostupné z: <http://www.hampapartiet.se/09.pdf>
- [11] DUPAL, Libor. *Kniha o marihuaně*. Vyd. 2. Praha : Mat'a, 2004. 135 s. ISBN 80-7287-082-3
- [12] <http://www.cannapedia.cz/cs/slovník-konopných-pojmů/tetrahydrokanabinol-thc>
- [13] <http://www.cannapedia.cz/cs/kanabidiol-cbd-různé-způsoby-jeho-aplikace>
- [14] Biotechnology and Medical Marijuana. Montana BioTech [online]. 2011 [cit. 2016-03-22]. Dostupné z: <http://montanabiotech.com/2011/03/16/biotechnology-and-medicalmarijuana/>
- [15] Kanabinoid CBG a CBGA. *Kanabinoidy* [online]. Kanabinoidy, 2017 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: <https://kanabinoidy.cz/kanabinoid-cbg-a-cbga/>
- [16] Jak funguje lidský endokanabinoidní systém v součinnosti s konopím. *Bylinky*. 2016, **2016**(1), 15-21. ISSN 2464-7365.
- [17] Endokanabinoidní systém a ovlivnění trombogeneze. *Vnitřní lékařství* [online]. 2010, 56(2), [cit. 2016-11-21]. Dostupné z WWW: <http://www.vnitrnilekarstvi.cz/>
- [18] ONAIVI, E. S., et al. Behavioral Effects of CB2 Cannabinoid Receptor Activation and Its Influence on Food and Alcohol Consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008, 123, s. 426-433
- [19] Endokanabinoidní systém a kardiometabolické riziko. *Medical tribune* [online]. 2008, 14, [cit. 2011-02-21]. Dostupné z WWW: < <http://www.tribune.cz/>>
- [20] Kanabinoidy a duševní poruchy. *Česká a slovenská psychiatrie*[online]. 2008, 104, [cit 2017-01-04]. Dostupné z <http://psych.lf1.cuni.cz/zf/publikace/h015.pdf>

- [21] FIŠAR, Zdeněk. *Endokanabinoidy* [online]. , 1-9 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_05_314-322.pdf
- [22] HAZEKAMP, Arno; GROTENHERMEN, Franjo. Review on clinical studies with cannabis and cannabinoids 2005-2009. *Cannabinoids*, 2010, 5.special issue: 1-21.
- [23] HAZEKAMP, Arno; HEERDINK, Eibert R. The prevalence and incidence of medicinal cannabis on prescription in The Netherlands. *European journal of clinical pharmacology*, 2013, 69.8: 1575-1580
- [24] HAZEKAMP, Arno, et al. The medicinal use of cannabis and cannabinoids—an international cross-sectional survey on administration forms. *Journal of psychoactive drugs*, 2013, 45.3: 199-210.
- [25] MUDr. HRIB, Radovan, Praktické zkušenosti s prekripcí a používáním konopí pro léčebné účely v prostředí České republiky v léčbě bolesti. Conference Cannabis and Science 3, 18-19 April 2017 Brno.
- [26] RxList [online], [cit.2017-05-15].Marinol.Dostupné z WWW:<http://www.rxlist.com/>.
- [27] Cesamet [online], 2009 [cit.2017-05-15]. Dostupné z WWW:<http://www.cesamet.net/>.
- [28] Public Information Report on Sativex oromucosal Spray.[online], 2007 [cit.2017-05-15]. Dostupné z WWW:<http://www.mhra.gov.uk/>.
- [29] KONOPÍ A LEGISLATIVA: NEZNALOST ZÁKONA NEOMLOUVÁ. 2016. *Legalizace* [online]. Praha: Legal Publishing. Available at: <http://www.magazin-legalizace.cz/cs/articles/detail/2130-konopi-a-legislativa-neznalost-zakona-neomlouva>
- [30] Léčba konopím v ČR aneb jak to tedy je. 2016. *Czech Free Press* [online]. Available at: <http://www.czechfreepress.cz/konopi/lecba-konopim-v-cr-aneb-jak-to-tedy-je.html>
- [31] BEDNAŘÍKOVÁ, Martina. Rychlé metody stanovení antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů [online]. Zlín, 2013 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: <<http://theses.cz/id/pi2h97/>>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.
- [32] APPENDINO, Giovanni, Simon GIBBONS, Anna GIANA, Alberto PAGANI, Gianpaolo GRASSI, Michael STAVRI, Eileen SMITH a M. Mukhlesur RAHMAN. Antibacterial Cannabinoids from Cannabis sativa: A Structure–Activity Study. *Journal of Natural Products*. 2008, **71**(8), 1427-1430. DOI: 10.1021/np8002673. ISSN 0163-3864. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np8002673>
- [33] Is Marijuana The Next Big Antibiotic? *Herb* [online]. 2016 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://herb.co/2016/01/27/marijuana-next-big-antibiotic/>
- [34] CONRAD, Chris. *Konopí pro zdraví: fakta o léčivých účincích marihuany*. Praha: Pragma, 2001. ISBN 80-720-5834-7.
- [35] ALI, Esra M. M., ALMAGBOUL, Aisha Z. I., KHOGALI, Salwa M. E. and GERGEIR, Umelkheir M. A., 2012, Antimicrobial Activity of Cannabis sativa L. *Chinese Medicine* [online]. 2012. Vol. 03, no. 01p. 61-64. DOI 10.4236/cm.2012.31010. Retrieved from: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/cm.2012.31010>
- [36] ÁLVAREZ-BARRIENTOS, Alberto. Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000, č. 13, s. 167-195. DOI: 10.1128/CMR.13.2.167-195.2000
- [37] Disková difusní metodu na agaru (kvalitativní a semikvantitativní). In: *METODIKY ZJIŠŤOVÁNÍ CITLIVOSTI A KONTROLY ANTIBIOTICKÉ TERAPIE IN VITRO* [online]. [cit. 2014-12-09]. Dostupné

- z:http://fv1.vfu.cz/sekce_ustavy/infekcni_choroby_mikrobiologie/pedagog/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum05/3.gif
- [38] BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renata KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. Mikrobiologické laboratorní metody. Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6. Skriptum. VFU Brno
- [39] Agar dilution method showing MIC of 11 samples. In: Study of vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples [online]. 2012 [cit. 2014-12-09]. Dostupné 52 z: http://www.atmph.org/viewimage.asp?img=AnnTropMedPublicHealth_2012_5_3_178_98609_u1.jpg
- [40] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [41] Mee S.C., Sung C.K., Sang H.C., Jun H.W. (2007): The molecular structures and function of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Korean J. Med. Mycol.* 12: 129-138.
- [42] BETHEA, E. K., B. J. CARVER, A. E. MONTEDONICO a T. B. REYNOLDS. The inositol regulon controls viability in *Candida glabrata*. *Microbiology*. 2010-02-04, vol. 156, issue 2, s. 452-462. DOI: 10.1099/mic.0.030072-0. Dostupné z:<http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.030072-0>
- [43] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., VÁNA, J. Lékařská mikrobiologi. Narvil 1996, 558 stran]
- [44] ELSOHLY, Mahmoud A. *Marijuana and the cannabinoids: fakta o léčivých účincích marihuany*. Totowa, N.J.: Humana Press, c2007. ISBN 15-882-9456-0.
- [45] FERIOLI, V., et al. Analytical characterisation of hashish samples. *Chromatographia*, 2000, 52.1-2: 39-44.
- [46] ZOLLER, Otmar; RHYN, Peter; ZIMMERLI, Bernhard. High-performance liquid chromatographic determination of Δ 9-tetrahydrocannabinol and the corresponding acid in hemp containing foods with special regard to the fluorescence properties of Δ 9-tetrahydrocannabinol. *Journal of Chromatography A*, 2000, 872.1: 101-110.
- [47] HAZEKAMP, Arno, et al. Preparative isolation of cannabinoids from *Cannabis sativa* by centrifugal partition chromatography. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 2004, 27.15: 2421-2439
- [48] HAZEKAMP, Arno, Anja PELTENBURG, Rob VERPOORTE a Christian GIROUD. Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *Journal of Liquid Chromatography*. 2005, **28**(15), 2361-2382. DOI: 10.1080/10826070500187558. ISSN 1082-6076. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826070500187558>
- [49] kpt. RNDr. Pavel Tomíček: Analýza konopí a barbiturátů. Kriminalistický ústav VB 1987
- [50] Hazekamp A., Peltenburg A., Verpoorte R.: Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *J. Liq. Chromatogr.* 2005, 28, 2361-2382
- [51] HARMATHA, Juraj. *Chemie a biochemie přírodních látek. Cyklus Organická chemie, svazek 27: 4. FENYLPROPANOIDY, LIGNANY A JEJICH BIOLOGICKÉ ÚČINKY* [online]. , 1-26. Available at: http://www.academia.edu/17962042/Chemie_a_biochemie_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch_l%C3%A1tek

- [52] CHALABALA, M. a kol. Liekové formy, Učebnica pre farmaceutické fakulty. 2. vydání. Martin: Osveta, 1992. 382 s. ISBN 80-217-0154-4.

8 ZKRATKY

2-AG 2 arachidonolglycerol

MRSA - methicilin-restitentní zlatý stafylokok

THC - Δ^9 -trans-tetrahydrokanabinol

ABTS - (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfuric acid)diammonium salt)

ML - *Micrococcus luteus*

SM - *Serratia marcescens*

CA - *Candida glabrata*

FBB - Fast Blue B Salt

CBC - kanabichromen

CBD - kanabidiol

CBN – kanabinol

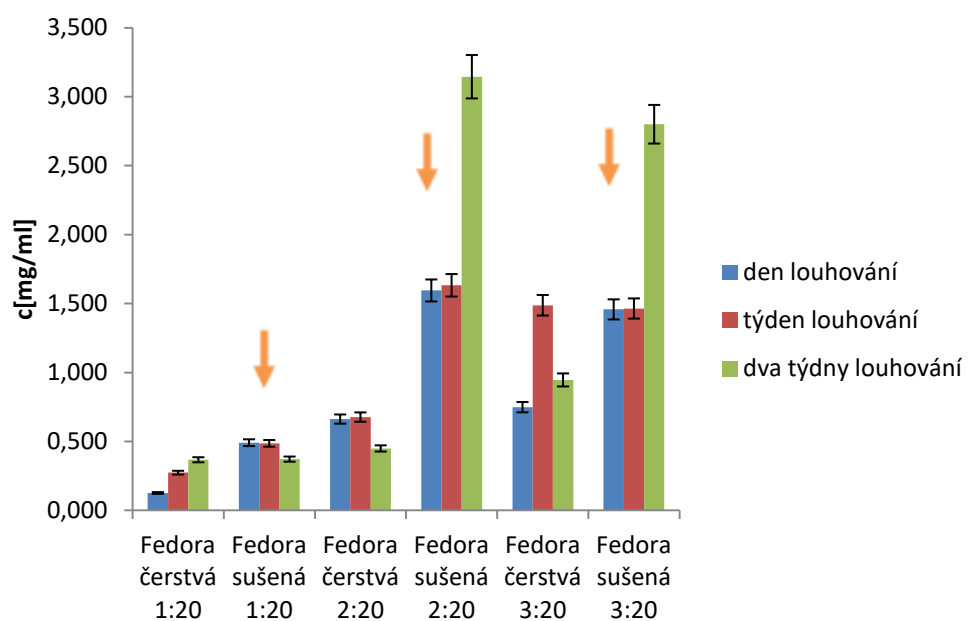
CBG - kanabigerol

TLC – tenkovrstvá chromatografie

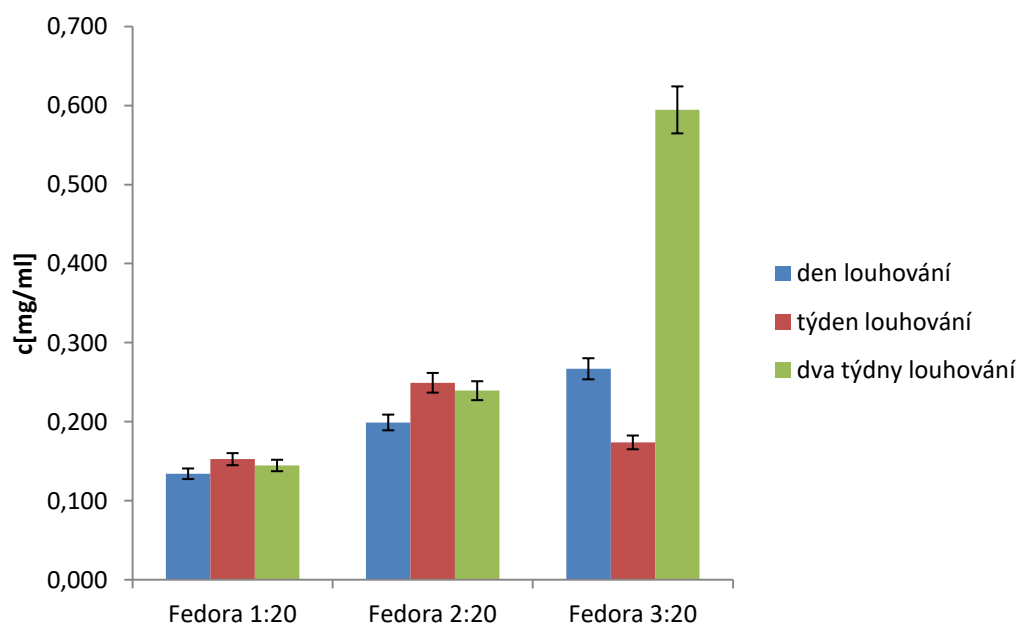
CBDA – kyselina kanabidiolová

CBGA – kyselina kanabigerolová

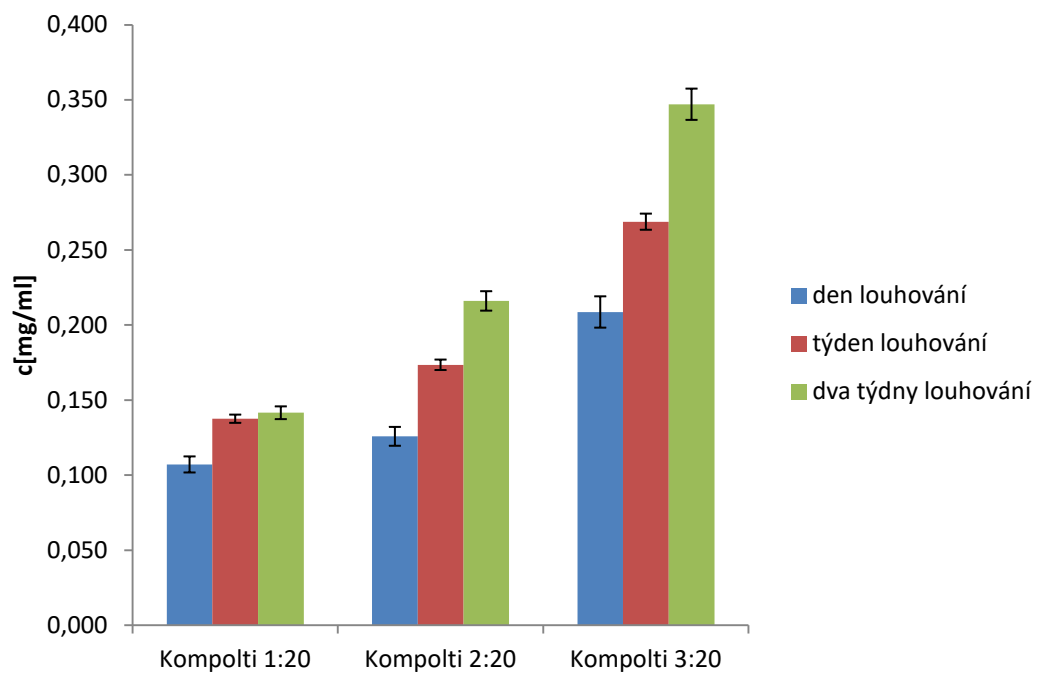
9 PŘÍLOHY



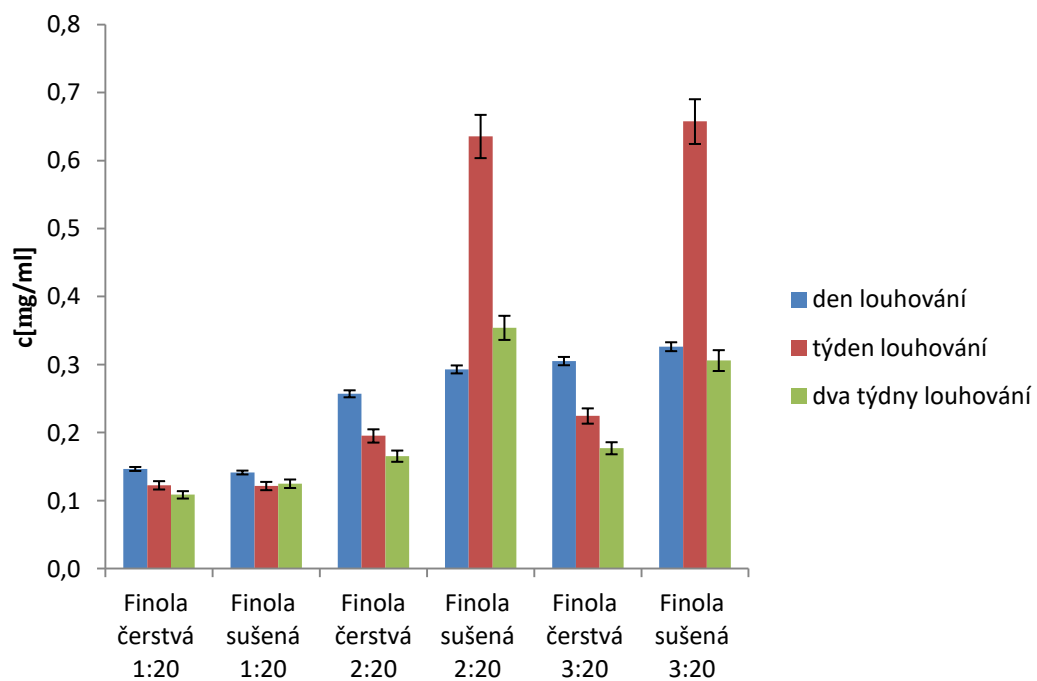
Příloha 1: Obsah polyfenolů Fedora květ



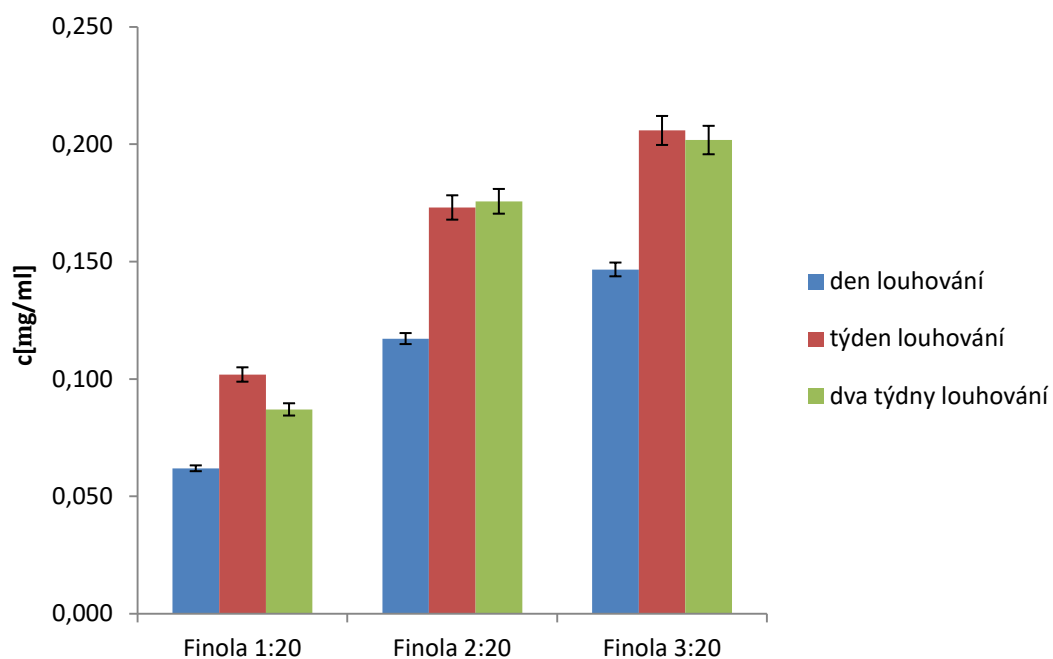
Příloha 2: Obsah polyfenolů Fedora stonek



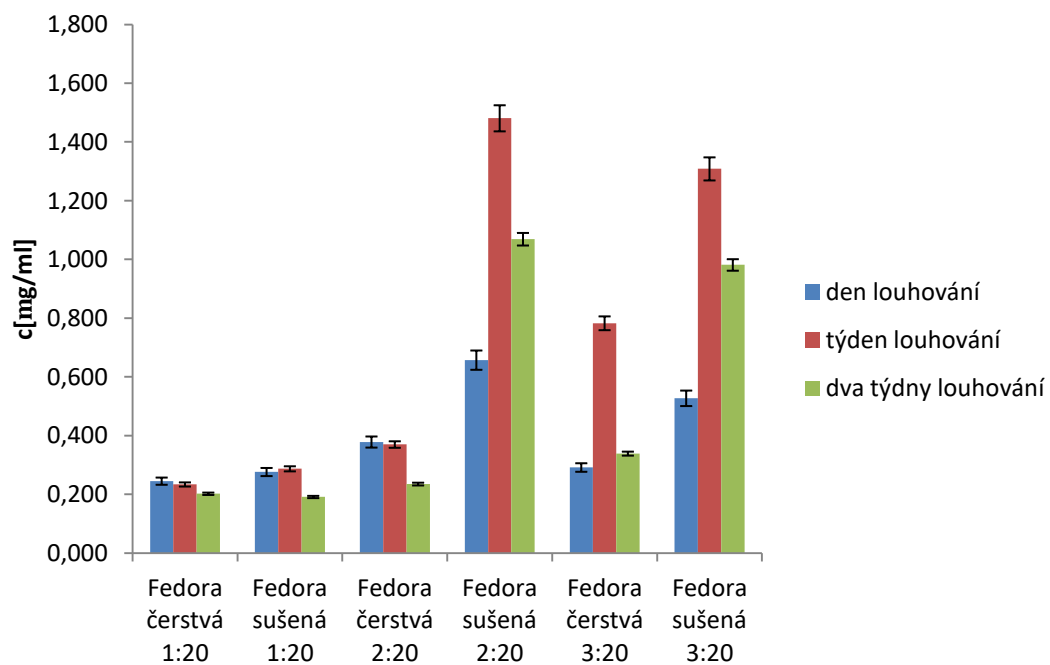
Příloha 3 : Obsah polyfenolů Kompoliti stonků



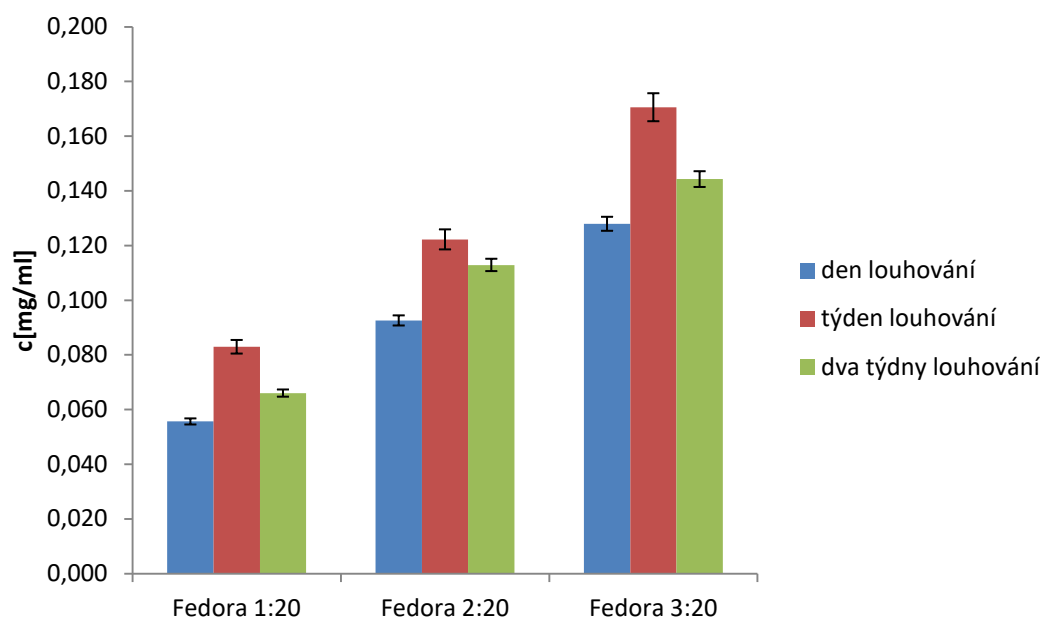
Příloha 4: Obsah flavonoidů Finola květ



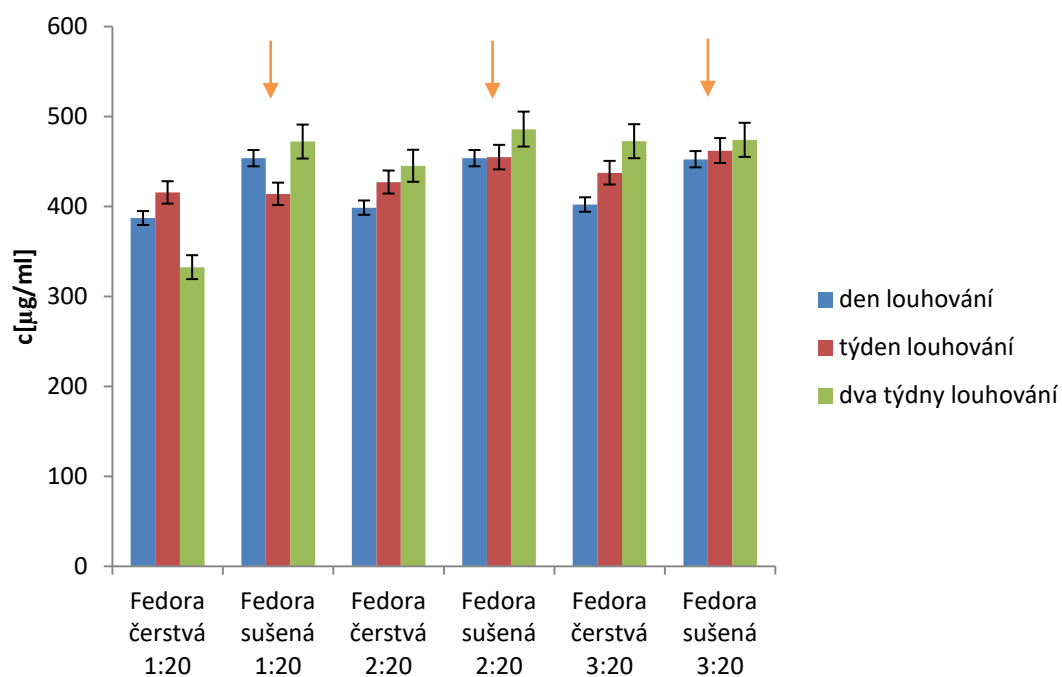
Příloha 5: Obsah flavonoidů Finola stoněk



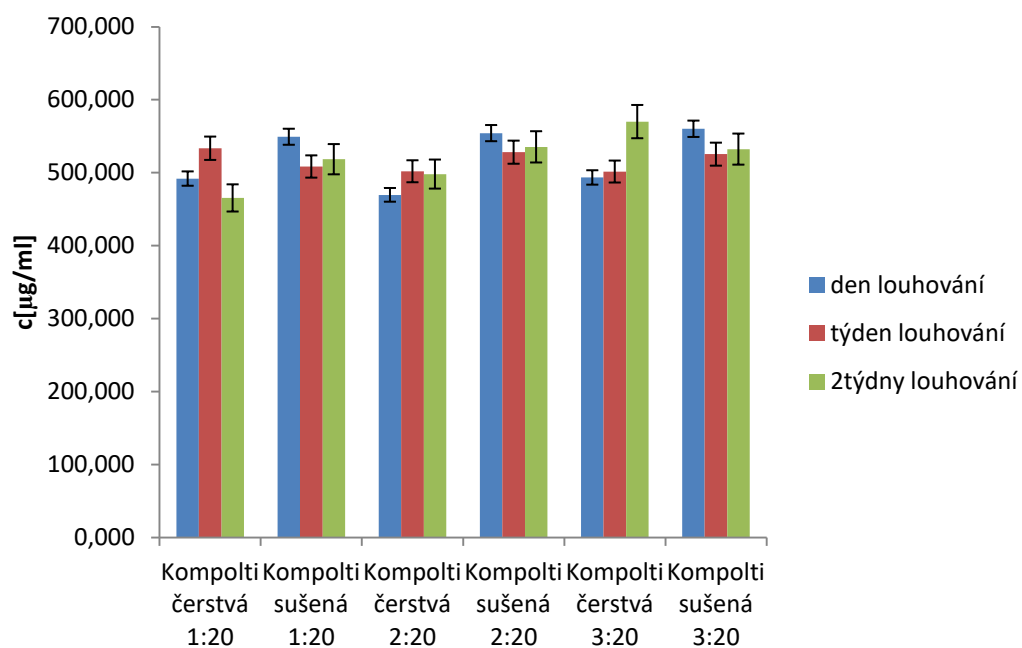
Příloha 6: Obsah flavonoidů Fedora květ



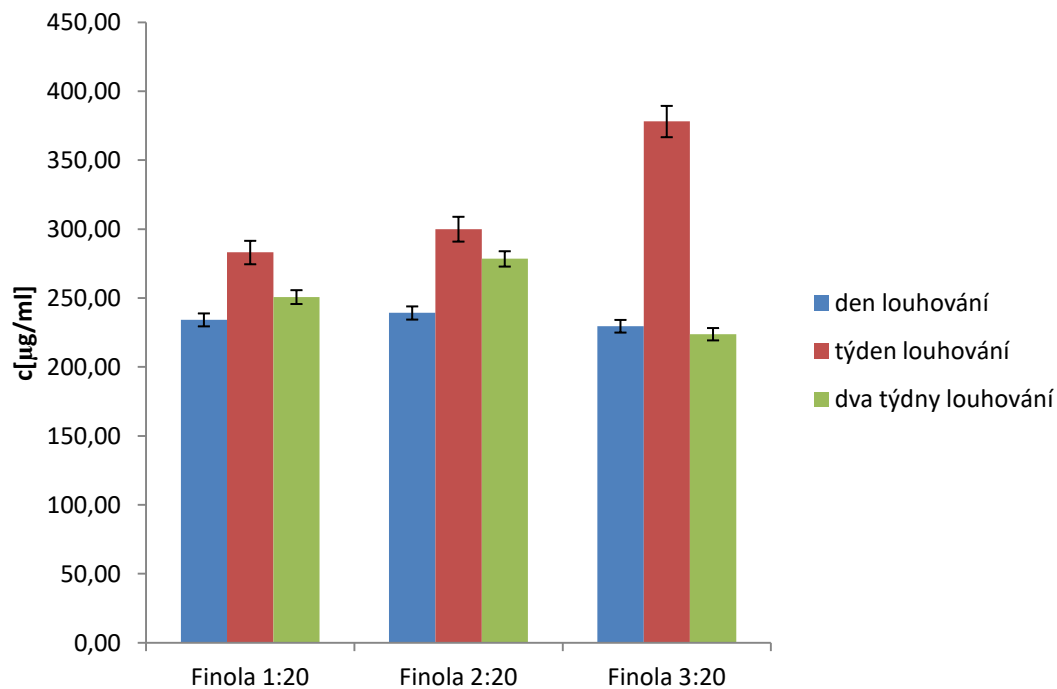
Příloha 7: Obsah flavonoidů Fedora stonků



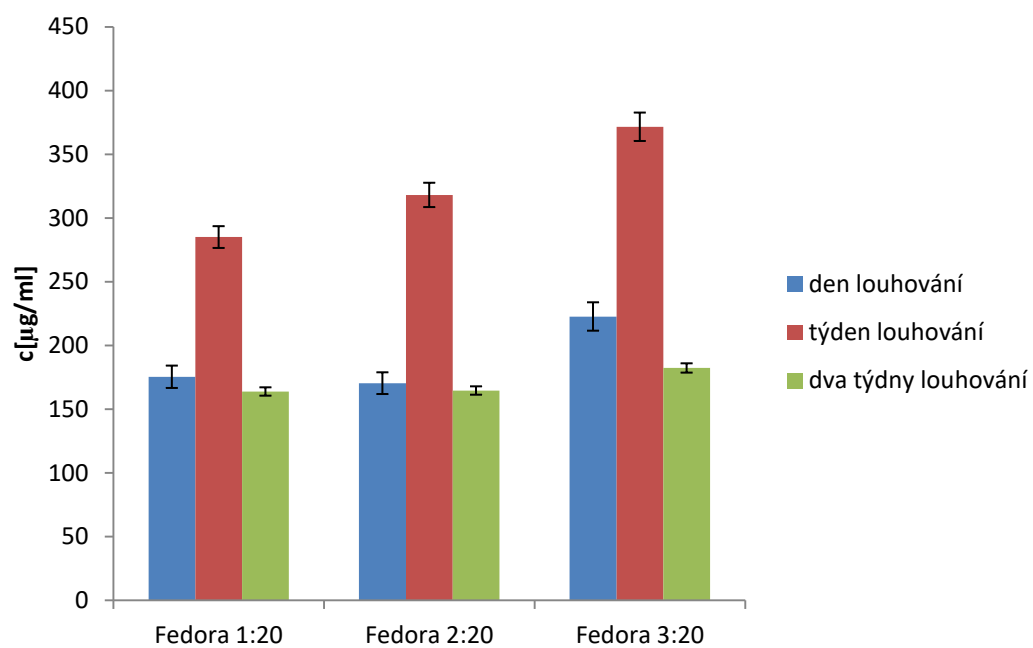
Příloha 8: Antioxidační aktivita Fedora květ



Příloha 9: Antioxidační aktivita Kompolti květ



Příloha 10: Antioxidační aktivita Finola stonek



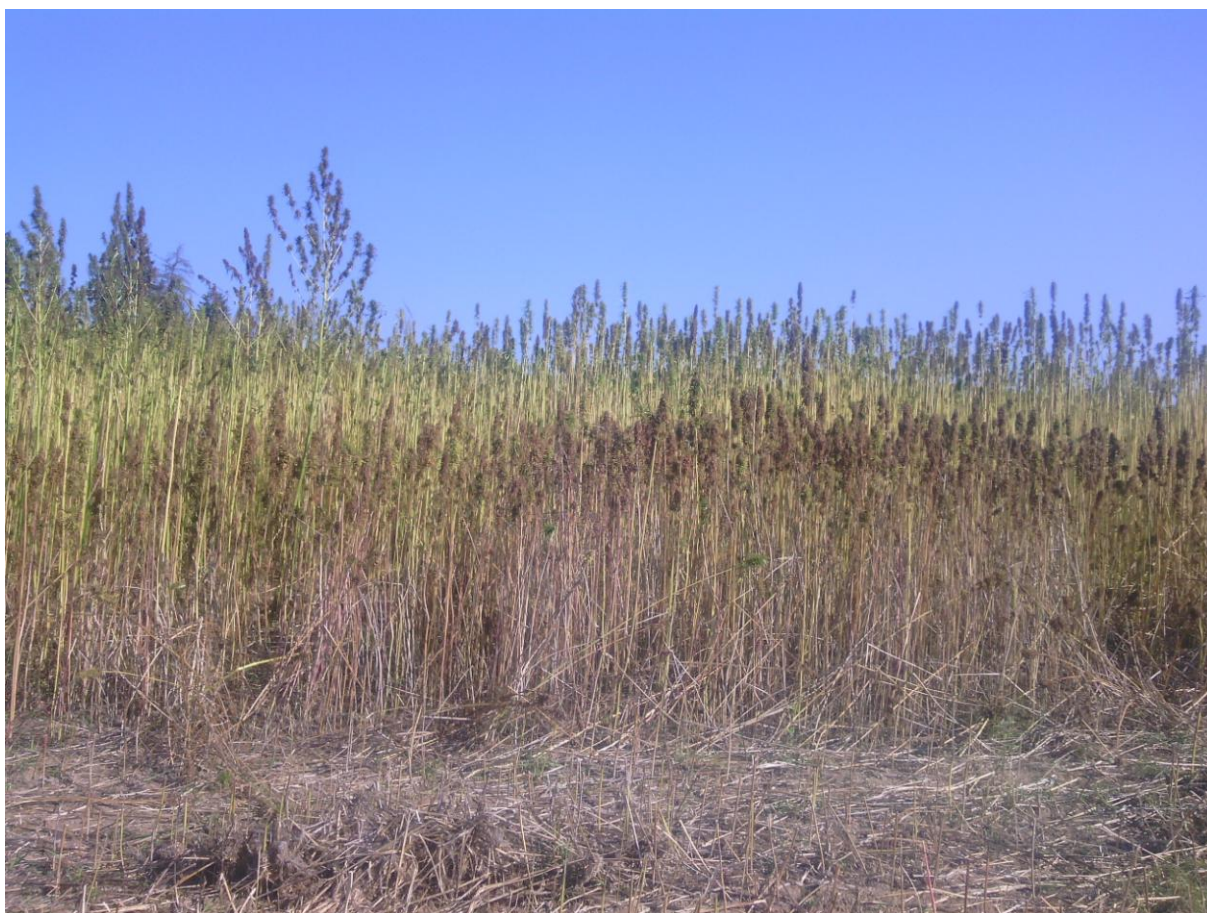
Příloha 11: Antioxidační aktivita Fedora stonek



Příloha 12: Kompoli



Příloha 13: Kompolti



Příloha 14: Konopné pole



Příloha 15: Kombajn na sklízění konopí



Příloha 16: Účast na Cannafestu v Praze - získání informací pro analýzu konopí od mezinárodních společností



Příloha 17: Potvrzení účasti na Conference Cannabis and Science 3